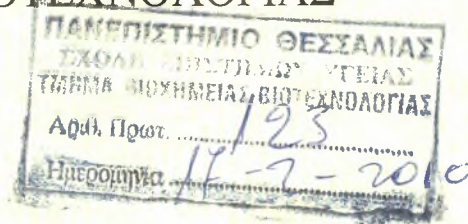




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ LEISHMANIA ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Μ. ΚΟΣΚΙΝΙΩΤΗ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8146/1

Ημερ. Εισ.: 22-04-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΚΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087091



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ LEISHMANIA ΣΕ ΣΚΥΛΟΥΣ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Μ. ΚΟΣΚΙΝΙΩΤΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθ. Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Πετεινάκη Ευθυμία

Επίκουρος Καθ. Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπιλλίνης Χαράλαμπος

Επίκουρος Καθ. Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

	Σελ.
Περίληψη.....	1
Εισαγωγή.....	2
Βιολογικός Κύκλος.....	3
Το παράσιτο <i>Leishmania</i>	5
Ταξινόμηση των ειδών <i>Leishmania</i>	6
Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της <i>Leishmania</i>	7
Φορέας – Μεταδότης.....	8
Ταξινόμηση των ειδών της σκνίπας.....	9
Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του φορέα.....	10
Ξενιστής – Δεξαμενή.....	13
Μορφές της Λεισμανίασης των σκύλων.....	14
Δερματική.....	14
Σπλαχνική.....	14
Παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό της έκφρασης των συμπτωμάτων και το μέγεθος της μόλυνσης.....	16
Διάγνωση της νόσου.....	17
1. Παρασιτολογικές τεχνικές.....	18
2. Ορολογικές δοκιμές.....	18
3. Μοριακές μέθοδοι.....	18
Θεραπεία.....	19
Πρόληψη και έλεγχος.....	19
Μετάδοση της νόσου.....	20
Επιδημιολογία.....	21
Πειραματικό Μέρος.....	25
Υλικά και Μέθοδοι.....	25
Α. 1. Ανοσοχρωματογραφική Μέθοδος.....	25
Β. 1. Εξαγωγή DNA.....	26
Β. 2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	26
Β. 3. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	30
Β. 4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	32
Γ. Μοριακή Κλωνοποίηση.....	33
Γ. 1. Ένθεση του rDNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	34
Γ. 2. Μετασχηματισμός κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης.....	38
Γ. 3. Επίστρωση τρυβλίων.....	39
Γ. 4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	40
Γ. 5. Πέψη πλασμιδιακού DNA.....	42
Γ. 6. Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.....	43
Δ. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.....	44
Αποτελέσματα.....	45
Ανοσοχρωματογραφική Μέθοδος.....	45
Ποσοτικοποίηση DNA.....	45
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	47
Πέψη πλασμιδιακού DNA.....	50
Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.....	52
Συζήτηση.....	53
Βιβλιογραφία.....	55

Περίληψη

Η λεισμανίαση είναι μια ζωνόσος που προκαλείται από διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania*, μέλους της οικογένειας *Trypanosomatidae*. Ένας από τους σημαντικότερους ξενιστές του παρασίτου αυτού είναι ο σκύλος, ο οποίος λειτουργεί και ως δεξαμενή της *Leishmania*, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο τη νόσο σε πολλές ενδημικές περιοχές (π.χ. Ν. Ευρώπη, Ν. Αμερική, Β. Αφρική, Μέση Ανατολή, κ.α.). Οι δύο μορφές της λεισμανίασης στους σκύλους είναι η σπλαχνική και η δερματική. Η μετάδοση του παρασίτου πραγματοποιείται μέσω του τσιμπήματος της θηλυκής σκνίπας του γένους *Phlebotomus*, η οποία λειτουργεί ως φορέας της λεισμανίασης. Το είδος του παρασίτου, που βρέθηκε να προσβάλλει τους σκύλους στην Ελλάδα είναι η *L. infantum*, η οποία προκαλεί τη σπλαχνική μορφή της νόσου. Το είδος αυτό έχει ανιχνευθεί σε περιοχές της χώρας όπως η Κρήτη, τα Ιόνια νησιά, η Βορειοδυτική Ελλάδα και η ευρύτερη περιοχή της Αθήνας.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των ειδών *Leishmania* που προκαλούν την ασθένεια στους σκύλους της περιοχής της Θεσσαλίας. Έτσι, συγκεντρώθηκαν δείγματα μυελού των οστών από 81 σκύλους της ευρύτερης περιοχής, με σκοπό την ανίχνευση των παρασίτων μέσω ανοσολογικών και μοριακών τεχνικών.

Εισαγωγή

Η **Λεϊσμανίαση** είναι μια παρασιτική ζωνοσός η οποία είναι ενδημική σε πολλά μέρη του κόσμου (Ευρώπη, Β. Αφρική, Μέση Ανατολή, Κεντρική και Ν. Αμερική, κ.α.), επικρατεί κυρίως σε τροπικές και υπο-τροπικές χώρες και μπορεί να βρεθεί σε περίπου 88 διαφορετικές χώρες. Μπορεί να προσβάλλει τόσο τον άνθρωπο όσο και τον σκύλο, την αλεπού και τα τρωκτικά. Στην ουσία αποτελεί ένα σύμπλεγμα ασθενειών που προκαλούνται από διάφορα είδη του παρασίτου *Leishmania* και μεταδίδεται με το τσίμπημα της θηλυκής σκνίπας του γένους *Phlebotomus*.¹

Η ταυτότητα του ανθρώπου που ανακάλυψε πρώτος το παράσιτο *Leishmania* είναι κατά κάποιο τρόπο αμφισβητούμενη. Είναι πιθανό ότι ο επικεφαλής χειρουργός του Βρετανικού Ινδικού στρατού, Cunningham, ήταν ο πρώτος που το είδε το 1885, δεν μπόρεσε όμως να το συνδέσει με την ασθένεια.^{2,3} Ο Peter Borovsky, ένας Ρώσος στρατιωτικός χειρουργός που δούλευε στο Tashkent, διεξήγαγε έρευνα για την αιτιολογία του ανατολικού έλκους (*oriental sore*), το οποίο είχε την τοπική ονομασία *Sart sore*, και το 1898 δημοσίευσε την πρώτη ακριβή περιγραφή του αιτιολογικού παράγοντα, περιέγραψε σωστά την παρασιτική σχέση του με τους ιστούς του ξενιστή και το συσχέτισε με τα Πρωτόζωα. Ωστόσο, επειδή τα αποτελέσματά του δημοσιεύθηκαν σε ένα ρωσικό περιοδικό χαμηλής κυκλοφορίας, η προτεραιότητά του δεν αναγνωρίστηκε διεθνώς κατά τη διάρκεια της ζωής του (από Hoare C.A., 1938).⁴ Το 1901, ο Leishman ταυτοποίησε συγκεκριμένους οργανισμούς σε επιχρίσματα από το σπλήνα ασθενούς με πυρετό dum-dum (*dum-dum fever*, *Dum Dum* είναι μια περιοχή κοντά στην Καλκούτα) και το 1903 ο Charles Donovan (1863-1951) περιέγραψε τον οργανισμό αυτό ως νέο (από WHO: *Leishmaniasis: background information*).⁵ Τελικά, ο Ronald Ross απέδειξε τη σύνδεση του παρασίτου με την ασθένεια και ονόμασε τον οργανισμό *Leishmania Donovan*i. Όσον αφορά τη λεϊσμανίαση σε σκύλους, η πρώτη φορά που ταυτοποιήθηκε ήταν το 1903 στην Ευρώπη (από Leonard Goodwin, 2009).⁶

Μετά την ανακάλυψη του αιτιολογικού παράγοντα της λεϊσμανίασης ακολούθησαν πολλές έρευνες για τον προσδιορισμό του τρόπου μετάδοσης της νόσου. Οι σκνίπες του γένους *Phlebotomus* θεωρήθηκαν ύποπτες ως φορείς της *Leishmania* από πολύ νωρίς (Sergents, 1904 - από *Sergeant, Edm. et al.*, 1934), όταν παρατηρήθηκε ότι τα αναπτυξιακά στάδια των παρασίτων, που βρισκόταν στο έντερο σκνιπών (οι οποίες είχαν απομυζήσει αίμα από ασθενείς με λεϊσμανίαση), ήταν ίδια με εκείνα των παρασίτων που αναπτύχθηκαν στις εργαστηριακές καλλιέργειες.⁷ Παρά την ανακάλυψη αυτής της αναπτυξιακής μορφής του παρασίτου αλλά και της μετακίνησής του στον οισοφάγο, το φάρυγγα και τελικά στη στοματική κοιλότητα των εργαστηριακών εντόμων, όλες οι προσπάθειες για επίτευξη μόλυνσης των εργαστηριακών ζώων ή ανθρώπων-εθελοντών οδηγήθηκαν σε αποτυχία. Ωστόσο, αναφέρθηκαν κάποιες επιτυχίες μολύνσεις σε χάμστερ, μετά το τσίμπημα από μολυσμένες σκνίπες *Phlebotomus argentipes* (Shortt et al., 1931, Napier et al., 1933 και Smith and Murkijee, 1936 - από το *Napier L. E., et al.* 1933).⁸ Μόνο τρεις από εκείνες τις πολυάριθμες δοκιμές ήταν επιτυχείς. Μετά από πολλά πειράματα που ακολούθησαν, ανακαλύφθηκε ότι, όταν οι σκνίπες τρέφονταν με μολυσμένο αίμα και στη συνέχεια με νέκταρ φυτών, το πρόσθιο τμήμα του εντέρου, ο οισοφάγος και ο φάρυγγας γέμιζαν με πολύ μεγάλο αριθμό παρασίτων, με αποτέλεσμα τα έντομα αυτά να μην έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν αίμα από τα θηλαστικά. Προσπαθούσαν

ξανά και ξανά να τραφούν και το μόνο που πετύχαιναν ήταν να απελευθερώνουν μεγάλο αριθμό παρασίτων στο δέρμα του ξενιστή. Διάφορα πειράματα, βασισμένα σε αυτό το σκεπτικό, απέδειξαν τη μετάδοση της λείσμανιάσης σε ποντίκια και χάμστερ το 1940 και 1941 (από Smith, R. O. A., Halder, K. C. and Ahmed J., 1941).⁹ Τελικά, οι Swanimath et al. (1942) μετέδωσαν με επιτυχία την ασθένεια και σε ανθρώπους-εθελοντές μέσω μολυσμένων σκνιπών *Phlebotomus*.¹⁰

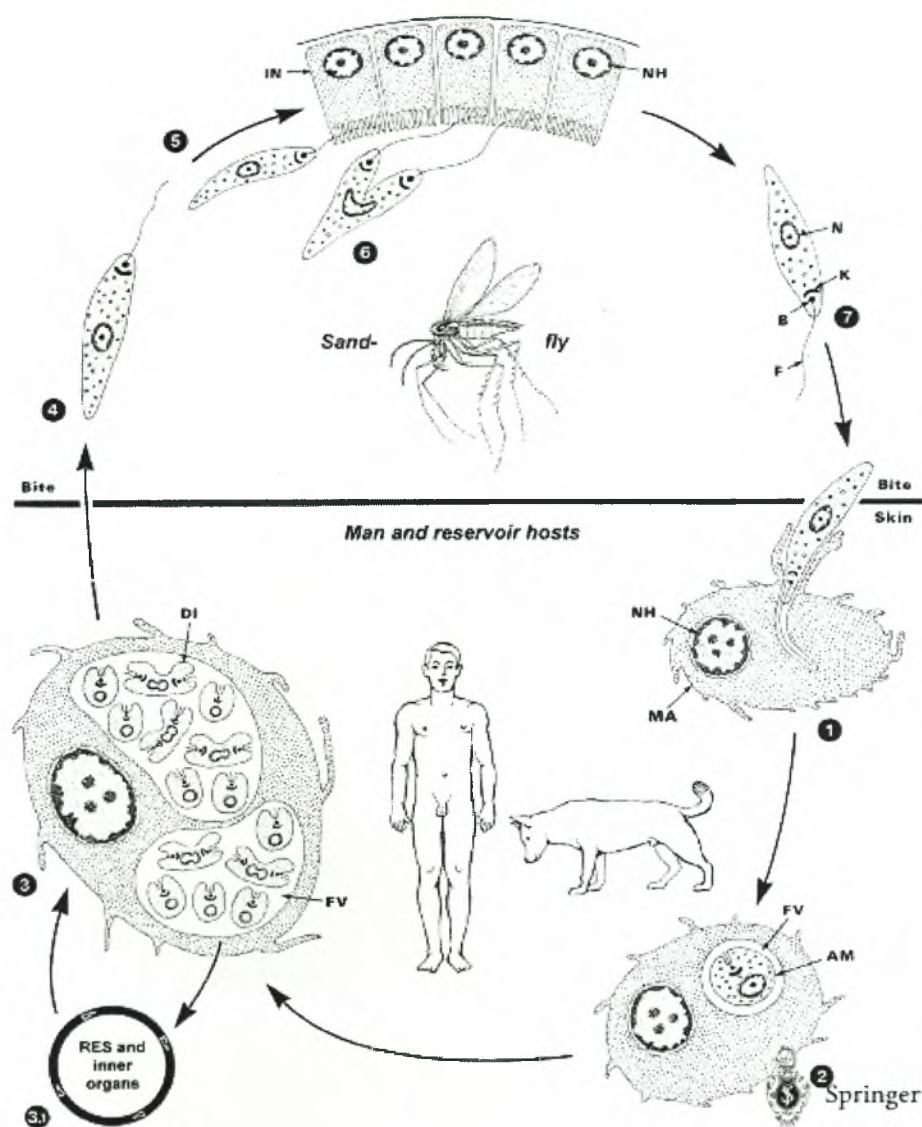
Βιολογικός Κύκλος:

Οι ξενιστές της *Leishmania* στη φύση μπορεί να είναι έντομα (σκνίπες του γένους *Phlebotomus*), όπου το παράσιτο έχει τη μορφή **μαστιγοφόρου προμαστιγώτη** ή θηλαστικά όπου το παράσιτο έχει τη μορφή **ενδοκυττάριου αμαστιγώτη**.

Όταν μία μολυσμένη θηλυκή σκνίπα απομυζήσει αίμα από ένα θηλαστικό, διοχετεύει **μολυσματικούς προμαστιγώτες** στο δέρμα του ξενιστή. Εκεί, τα παράσιτα αυτά φαγοκυτταρώνονται ταχύτατα από τα μακροφάγα του δέρματος. Στη φάση αυτή, τα παράσιτα μετατρέπονται στην αμαστιγώτη μορφή τους, η οποία έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται ταχύτατα με απλή διχοτόμηση μόνο μέσα στα φαγοκύτταρα του ξενιστή (συγκεκριμένα στο πιο αφιλόξενο μέρος των μακροφάγων, τα φαγολυσσώματα!). Ο πολλαπλασιασμός των αμαστιγωτών οδηγεί τελικά στη λύση του κυττάρου με αποτέλεσμα τη μόλυνση παρακείμενων μακροφάγων και την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος.

Όταν μια θηλυκή σκνίπα απομυζήσει αίμα από ένα μολυσμένο θηλαστικό, προσλαμβάνει **ενδοκυττάριους** (ή πιθανόν και εξωκυττάριους) **αμαστιγώτες** που βρίσκονται μέσα στα μακροφάγα (ή πιθανόν ελεύθερα στην κυκλοφορία του αίματος). Μέσα στο γεύμα αίματος, οι αμαστιγώτες μεταμορφώνονται σε κινούμενους προμαστιγώτες (μετακυκλικοί προμαστιγώτες). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και δύο ακόμη ενδιάμεσα στάδια στην ανάπτυξη του παρασίτου πριν τη διαφοροποίησή του σε μετακυκλικό προμαστιγώτη: η **νεκτομονάδα**, η οποία είναι μια ελεύθερη επιμηκυμένη μορφή προκυκλικού προμαστιγώτη και η **απομονάδα**, η οποία είναι μια μορφή προ- ή παραμαστιγώτη, που έχει την ικανότητα να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο μέσω του μαστιγίου που διαθέτει. Όλο αυτό το διάστημα η τροφή του εντόμου βρίσκεται εγκλωπωμένη μέσα σε μία **χιτινική περιτροφική μεμβράνη**, η οποία εκκρίνεται από το έντομο 4 ώρες μετά τη λήψη αίματος. Η μεμβράνη αυτή λειτουργεί ως φραγμός που επιβραδύνει τη διάχυση των λυτικών ενζύμων, που εκκρίνονται από τη σκνίπα ως απάντηση στη λήψη αίματος, ενώ έμμεσα προστατεύει και τα παράσιτα από τις επιβλαβείς συνέπειες των ενζύμων. Παρέχεται, έτσι, η ευκαιρία στους αμαστιγώτες να διαφοροποιηθούν στις δύο ενδιάμεσες μορφές του παρασίτου. Αυτές με τη σειρά τους, όταν διαλυθεί η περιτροφική μεμβράνη από τις χιτινάσες του εντόμου (3-4 ημέρες μετά τη λήψη αίματος), απελευθερώνονται στον αυλό του εντέρου και προσκολλώνται στο εντερικό επιθήλιο με τα μαστίγια τους. Τελικά, 7 ημέρες μετά τη λήψη του αίματος τα παράσιτα διαφοροποιούνται σε μετακυκλικούς προμαστιγώτες.¹⁸ Το παράσιτο στη μορφή του προμαστιγώτη έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται με μεγάλη ένταση μόνο μέσα στο έντερο του εντόμου.¹¹ Συγκεκριμένα, ο πολλαπλασιασμός αυτός λαμβάνει χώρα στο μέσο έντερο (για το υπο-γένος *Leishmania* σύμφωνα με τους Laison and Shaw¹²) ή στο οπίσθιο και το μέσο έντερο (για το υπο-γένος *Viannia*). Ανεξάρτητα από το μέρος του πολλαπλασιασμού, τα παράσιτα μεταναστεύουν τελικά στο πρόσθιο μέρος του μέσου εντέρου της σκνίπας

και στη συνέχεια κινούνται μέσω του φάρυγγα προς τη στοματική κοιλότητα του εντόμου. Η μορφή που έχουν τα παράσιτα της *Leishmania* σε αυτή τη φάση είναι και η μοναδική που μπορεί να μολύνει τα σπονδυλωτά. Έτσι, την επόμενη φορά που η σκνίπα θα απομυζήσει αίμα από κάποιο θηλαστικό, (σκύλο ή άνθρωπο, κ.α.) θα διοχετεύσει στο δέρμα του τους μετακυκλικούς προμαστιγώτες, που βρίσκονται στη στοματική της κοιλότητα.¹



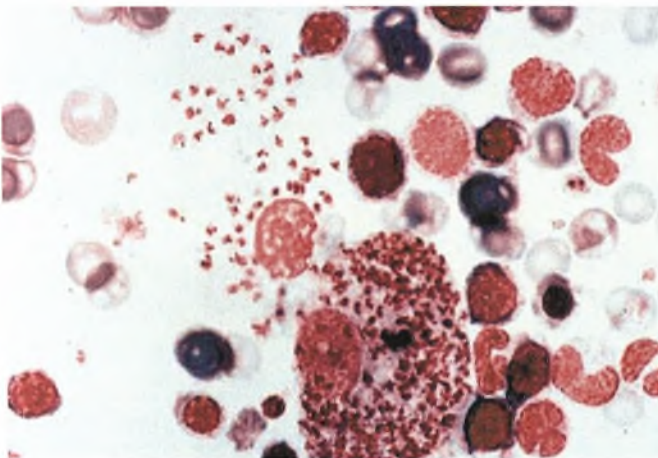
Εικόνα 1: Ο βιολογικός κύκλος της *Leishmania*: 1) Μετά το τσίμπημα ενός θηλαστικού από μολυσμένη σκνίπα, διοχετεύονται στο δέρμα του θηλαστικού μολυσματικοί προμαστιγώτες οι οποίοι φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα του ξενιστή, 2) Μεταμόρφωση σε αμαστιγώτες μέσα στα μακροφάγα, η οποία απαιτεί 1-4 ώρες και πολλαπλασιασμός του παρασίτου, 3) Λύση των μακροφάγων (μετά από 48 ώρες) λόγω του πολλαπλασιασμού των παρασίτων και απελευθέρωση των αμαστιγιωτών οι οποίοι μπορούν να μολύνουν άλλα φαγοκύτταρα, 3.1) οι αμαστιγιώτες μερικών ειδών *Leishmania* μπορεί να εισέλθουν στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (RES) και να μεταφερθούν σε εσωτερικά όργανα του ξενιστή προκαλώντας σπλαχνική λεισμανίαση (μέσα σε 4-6 μήνες), 4) Με την απομύζηση αίματος από το μολυσμένο σπονδυλωτό, η σκνίπα προσλαμβάνει και αμαστιγώτες, 5) οι οποίοι μετατρέπονται σε προμαστιγώτες μέσα στο έντερο του εντόμου, και 6) πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μεταφέρονται στη στοματική κοιλότητα του φορέα, 7) Με το επόμενο τσίμπημα, η σκνίπα μολύνει τον νέο ξενιστή.¹³

Το παράσιτο *Leishmania*:

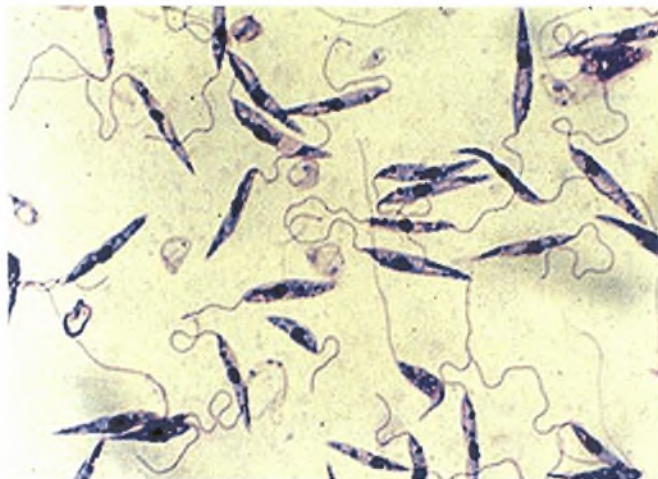
Η *Leishmania* είναι ένα πρωτόζωο που ανήκει στην τάξη *Kinetoplastida* και την οικογένεια *Trypanosomatidae*. Πρόκειται για ένα διμορφικό παράσιτο το οποίο εμφανίζεται σε δύο κύρια μορφολογικά στάδια: τον **ενδοκυττάριο αμαστιγώτη** (Εικ. 2), που αναπτύσσεται μέσα στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα του θηλαστικού-ξενιστή, και το **μαστιγοφόρο προμαστιγώτη** (Εικ. 3), που αναπτύσσεται μέσα στο έντερο του εντόμου-φορέα.¹

Στο στάδιο του αμαστιγώτη, το παράσιτο έχει σχήμα κυκλικό ή ωοειδές με διάμετρο περίπου 2-6 μm και περιέχει έναν πυρήνα, έναν κινητοπλάστη και ένα εσωτερικό μαστίγιο το οποίο διακρίνεται καθαρά σε ηλεκτρονική μικροφωτογραφία. Οι αμαστιγώτες πολλαπλασιάζονται μέσα σε παρασιτοφόρα κενοτόπια των μακροφάγων.¹

Στο στάδιο του προμαστιγώτη, το σώμα του παρασίτου είναι μακρύ και λεπτό (περίπου 15-30 μm μήκος και 2-3 μm πλάτος), με έναν κεντρικό πυρήνα, έναν κινητοπλάστη και ένα μακρύ ελεύθερο πρόσθιο μαστίγιο.¹



Εικόνα 2¹⁴: Παράσιτα *Leishmania* (αμαστιγώτες) μέσα σε μακροφάγα στο μυελό των οστών σκύλου



Εικόνα 3¹⁴: Παράσιτα *Leishmania* σε μορφή προμαστιγώτη

Ταξινόμηση των ειδών *Leishmania*:

Η διάκριση των διαφορετικών ειδών *Leishmania* δεν μπορεί να γίνει από την μορφολογία τους και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν άλλα κριτήρια. Τέτοιου είδους κριτήρια μπορεί να είναι εξωγενή (π.χ. κλινικά χαρακτηριστικά, γεωγραφική κατανομή, συμπεριφορά σε καλλιέργεια, φορείς εργαστηρίου) ή ενδογενή (π.χ. ανοσολογικά, βιοχημικά ή μοριακά κριτήρια).¹⁵ Μεταξύ όλων αυτών των κριτηρίων, η ανάλυση ισοενζύμων με ηλεκτροφόρηση και οι τεχνικές που βασίζονται στο DNA είναι οι πιο διαδεδομένες.

Έχουν προταθεί πολλοί τύποι ταξινόμησης για το γένος *Leishmania*. Ένας από αυτούς τους τύπους φαίνεται στον Πίνακα 1, όπου αποκαλύπτεται μια γονική σχέση μεταξύ των διαφόρων ειδών *Leishmania*. Σύμφωνα με αυτή τη φυλογενετική ταξινόμηση τα είδη του παρασίτου ομαδοποιούνται σε διάφορα συμπλέγματα, ενώ παρατηρείται η ύπαρξη δύο υποειδών (*Leishmania* και *Viannia*).^{16,17}

Πίνακας 1: Απλοποιημένη ταξινόμηση του γένους *Leishmania*, προερχόμενη από τη φυλογενετική ανάλυση των Rioux et al., βασισμένη σε ισοένζυμα.¹⁶

I.Sub-genus *Leishmania* Ross, 1903¹⁹

<i>L. donovani</i> complex	<i>L. donovani</i> (Laveran & Mesnil, 1903) <i>L. archibaldi</i> Castellani & Chalmers , 1919
<i>L. infantum</i> complex	<i>L. infantum</i> Nicolle, 1908 (syn. <i>L. chagasi</i> Cunha & Chagas, 1937)
<i>L. tropica</i> complex	<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)
<i>L. killicki</i> complex	<i>L. killicki</i> Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986
<i>L. aethiopica</i> complex	<i>L. aethiopica</i> Bray, Ashford & Bray, 1973
<i>L. major</i> complex	<i>L. major</i> Yakimoff & Schokhor, 1914
<i>L. turanica</i> complex	<i>L. turanica</i> Strelkova, Peters & Evans, 1990
<i>L. gerbilli</i> complex	<i>L. gerbilli</i> Wang, Qu & Guan, 1964
<i>L. arabica</i> complex	<i>L. arabica</i> Peters, Elbihari & Evans, 1986
<i>L. mexicana</i> complex	<i>L. mexicana</i> Biagi, 1953 (syn. <i>L. pifanoi</i> Medina & Romero, 1959)
<i>L. amazonensis</i> complex	<i>L. amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972 (syn. <i>L. garnhami</i> Scorza et al., 1979) <i>L. aristidesi</i> Lainson & Shaw, 1979
<i>L. enriettii</i> complex	<i>L. enriettii</i> Muniz & Medina, 1948
<i>L. hertigi</i> complex	<i>L. hertigi</i> Herrer, 1971 <i>L. deanei</i> Lainson & Shaw, 1977

II. Sub-genus *Viannia* Lainson and Shaw, 1987²⁰

<i>L. braziliensis</i> complex	<i>L. braziliensis</i> Vianna, 1911.
--------------------------------	--------------------------------------

	<i>L. peruviana</i> Velez, 1913
<i>L. guyanensis</i> complex	<i>L. guyanensis</i> Floch, 1954 <i>L. panamensis</i> Lainson & Shaw, 1972 <i>L. shawi</i> Lainson et al., 1989
<i>L. naiffi</i> complex	<i>L. naiffi</i> Lainson & Shaw, 1989
<i>L. lainsoni</i> complex	<i>L. lainsoni</i> Silveira et al., 1987

Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της *Leishmania*:

Το παράσιτο της *Leishmania* έχει βρεθεί σε περίπου 88 χώρες σε όλο τον κόσμο. Από αυτές, οι 22 είναι χώρες του Νέου Κόσμου (περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής), και οι 66 του Παλαιού Κόσμου (περιοχές της Αφρικής, της Ινδίας, της Μέσης Ανατολής, της Ασίας, της Νότιας Ευρώπης και της Μεσογείου).²¹

Παλιός Κόσμος:

Η *L. infantum* συναντάται σε χώρες γύρω από τη Μεσόγειο Θάλασσα, στην Πορτογαλία, στη Βόρεια, Ανατολική και Δυτική Αφρική, στη Μέση Ανατολή (Ιράκ, Ιράν, Πακιστάν, Αφγανιστάν), στην Ινδία και την Κίνα.^{22, 23}

Η *L. donovani* βρίσκεται στην Ανατολική Αφρική και το Σουδάν.²⁰

Η *L. tropica* συναντάται στη Μέση Ανατολή (Αφγανιστάν, Ιράν), στην Ινδία, στις χώρες της Μεσογείου, στη Δυτική και Κεντρική Ασία και στην Κεντρική και Βόρεια Αφρική (Κένυα).²⁰

Η *L. major* συναντάται στη Μέση ανατολή, στην Ινδία, στις χώρες της Μεσογείου, στη Δυτική και Κεντρική Ασία, στην Κεντρική και Βόρεια Αφρική (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία) και στη Βορειοδυτική Κίνα.²⁰

Η *L. aethiopica* βρίσκεται στην Ανατολική Αφρική (Αιθιοπία, Κένυα) και στην Υεμένη.²⁰

Η *L. arabica* συναντάται στη Σαουδική Αραβία, η *L. killicki* στην Τυνησία, ενώ τα είδη *L. turanica* και *L. gerbilli* συναντώνται στην Κεντρική Ασία.¹

Νέος Κόσμος:

Η *L. chagasi* συναντάται στην Κεντρική και Νότια Αμερική (Βραζιλία, Βενεζουέλα, Κολομβία)²⁰ και σε μικρές ενδημικές περιοχές της Βόρειας Αμερικής (Οχάιο, Αλαμπάμα, Μίσιγκαν)²⁴, ενώ έχουν εμφανιστεί και μεμονωμένες περιπτώσεις σε άλλες χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Ελ Σαλβαδόρ, Γουατεμάλα, Ονδούρα, Νικαράγουα, Αργεντινή, Βολιβία, Παραγουάη).²⁰

Η *L. mexicana* βρίσκεται στην Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Ονδούρα, Γουατεμάλα) και στην περιοχή του Αμαζονίου.²⁰

Η *L. amazonensis* συναντάται σε χώρες της Νότιας Αμερικής, όπως Βολιβία, Βραζιλία (κυρίως στην περιοχή του Αμαζονίου), Περού και Βενεζουέλα.²⁵

Η *L. braziliensis* (*Viannia*) βρίσκεται σε χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής. Συγκεκριμένα, στη Βραζιλία (περιοχή Αμαζονίου, Ρίο ντε Τζανέιρο, Σάο Πάολο, κ.α.), στην Ονδούρα (Santa Barbara), στο Περού, στη Βενεζουέλα,²⁵ στον

Παναμά, στη Βολιβία και στην Κολομβία.²⁶ Η *L. peruviana* που ανήκει στο σύμπλεγμα της *L. braziliensis*, συναντάται στις Περουβιανές Άνδεις.

Η *L. guyanensis* (*Viannia*) βρίσκεται στη Νότια Αμερική και συγκεκριμένα σε περιοχές της Βόρειας Βραζιλίας και στη Γουιάνα (Guyana).²⁶

Η *L. panamensis* (*Viannia*) συναντάται σε χώρες της Κεντρικής Αμερικής (Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Ονδούρα) και στην Κολομβία.²⁶

Τα είδη *L. naiffi* (*Viannia*) και *L. lainsoni* (*Viannia*) βρίσκονται στη Βραζιλία.²⁷

Στην Ελλάδα συναντώνται μόνο δύο από τα παραπάνω είδη *Leishmania* του Παλαιού Κόσμου:

Το πιο ευρέως διαδεδομένο είναι η *L. infantum*^{28,31}, η οποία έχει ανιχνευθεί σε πολλές περιοχές της χώρας (κυρίως στην Κρήτη και στην ευρύτερη περιοχή των Αθηνών αλλά και στα Ιόνια νησιά και τη Βορειοδυτική Ελλάδα). Επίσης, η λεισμανίαση, που βρέθηκε σε αγροτικές περιοχές της ηπειρωτικής χώρας, της Κρήτης και κάποιων νησιών του Ιονίου, αποδείχθηκε ότι έχει προκληθεί από την *L. tropica*.^{29,30}

Φορέας - Μεταδότης:

Ο φορέας της λεισμανίασης είναι η θηλυκή σκνίπα που ανήκει στην τάξη *Diptera*, την οικογένεια *Psycholidae* και την υπο-οικογένεια *Phlebotomidae*. Ο βιολογικός κύκλος των εντόμων αυτών περιλαμβάνει δύο διαφορετικά βιολογικά στάδια: α) το στάδιο του ενηλίκου και β) τη φάση ανάπτυξης, η οποία περιλαμβάνει το στάδιο του αυγού, τέσσερα στάδια προνύμφης και το στάδιο της νύμφης, και η οποία λαμβάνει χώρα σε υγρό έδαφος, πλούσιο σε οργανική ύλη.³²



Εικόνα 4: Η σκνίπα-φορέας της *Leishmania* που ανήκει στο γένος *Phlebotomus*

Τα ενήλικα έντομα έχουν την ικανότητα να πετούν, είναι μικρά σε μέγεθος (περίπου 2-4 mm σε μήκος) και έχουν κιτρινωπό και τριχωτό σώμα με μαύρα μάτια. Τα φτερά τους είναι ωοειδή και λογχοειδή και βρίσκονται σε ανυψωμένη στάση πάνω στο θώρακα. Η διαφορά των θηλυκών με τα αρσενικά είναι ότι το σώμα των θηλυκών

είναι λίγο πιο σκουρόχρωμο. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, τα έντομα ξεκουράζονται σε σκοτεινά και σκεπαστά μέρη. Είναι δραστήρια στη δύση του ηλίου αλλά και κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η τροφή και των δύο φύλων είναι το νέκταρ των φυτών, όμως τα θηλυκά χρειάζονται και ένα γεύμα αίματος πριν καταστούν ικανά να γεννήσουν τα αυγά τους, προκειμένου να εξασφαλίσουν τις πρωτεΐνες που χρειάζονται για την ανάπτυξη των αυγών. Οι πιθανοί ξενιστές τους είναι ερπετά, αμφίβια, πουλιά και θηλαστικά. Οι διατροφικές τους συνήθειες εξαρτώνται από το είδος στο οποίο ανήκουν, ενώ η φύση του ξενιστή από τον οποίο παίρνουν το αίμα είναι ένα σημείο κλειδί για τη μετάδοση της *Leishmania*.¹

Οι προνύμφες είναι μικρές σε μέγεθος, έχουν λευκό χρώμα και ένα μαύρο θύλακα στην περιοχή του κεφαλιού, ενώ από το οπίσθιο τμήμα του σώματος ανέρχεται ένα ζευγάρι μακριών και σκούρων ουραίων τριχών οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για αυτό το είδος.

Ταξινόμηση των ειδών της σκνίπας:

Έχουν περιγραφεί πάνω από 500 είδη σκνίπας της υπο-οικογένειας **Phlebotomidae**, τα οποία συναντώνται σε ποικίλα μέρη του κόσμου και για τα οποία έχουν προταθεί πολλοί τύποι ταξινόμησης. Τα περισσότερα είδη ταξινομούνται σε τρία κύρια γένη: τα **Phlebotomus**, **Sergentomyia** και **Lutzomyia**.

Παρακάτω περιγράφονται τα είδη των δύο πιο σημαντικών γενών στη μετάδοση της *Leishmania* (**Phlebotomus** και **Lutzomyia**), εκ των οποίων πολλά είναι αποδεδειγμένοι φορείς.

Το γένος **Phlebotomus** χωρίζεται στα υπογένη: **Phlebotomus**³³ (*Ph. duboscqi*, *Ph. papatasi*, *Ph. salehi*), **Paraphlebotomus**³⁴ (*Ph. caucasicus*, *Ph. sergenti*, *Ph. similis*, *Ph. alexandri*), **Synphlebotomus**³⁴ (*Ph. celiae*, *Ph. martini*, *Ph. vansomeranae*, *Ph. rossi*,⁴² *Ph. ansarii*⁴²), **Larroussius**³⁵ (*Ph. ariasi*, *Ph. kandelakii*, *Ph. langeroni orientalis*, *Ph. longicuspis*, *Ph. longipes*, *Ph. major syriacus*, *Ph. perfillievi*, *Ph. perniciosus tobbi*, *Ph. pedifer*, *Ph. neglectus*,⁴² *Ph. smirnovi*,⁴² *Ph. transcaucasicus*,⁴² *Ph. guggisbergi*,⁴² *Ph. aculaetus*⁴²), **Adlerius**³⁵ (*Ph. chinensis chinensis*, *Ph. c. halepensis*, *Ph. c. longiductus*, *Ph. simici*, *Ph. balcanicus*), **Euphlebotomus**³⁴ (*Ph. argentipes*) και **Transphlebotomus**⁴⁴ (*Ph. mascittii*, *Ph. canaaniticus*, *Ph. economidesi*).

Στο γένος **Lutzomyia** ανήκουν: το υπογένος **Lutzomyia** (*Lu. longipalpis*, *Lu. renei*), η ομάδα **cruciata** (*Lu. cruciata*, *Lu. gomezi*), η ομάδα **migonei** (*Lu. migonei*), η ομάδα **vexator** (*Lu. sanguinaria*), το υποείδος **Nyssomyia** (*Lu. anduzei*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. intermedia*, *Lu. olmeca*, *Lu. trapedoi*, *Lu. whitmani*, *Lu. ylephiletor*), το υπογένος **Psychodopygus** (*Lu. wellcomei*, *Lu. panamensis*) και το υπογένος **Pintomyia** (*Lu. fisceri*, *Lu. pessoai*).³⁶



Εικόνα 5: Ο φορέας της Λείσμανιάσης που ανήκει στο γένος *Lutzomyia*
(<http://www.fiocruz.br>)

Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του φορέα:

Οι σκνίπες-φορείς του Παλαιού κόσμου ανήκουν στα γένη *Phlebotomus* και *Sergentomyia*, ενώ εκείνες του Νέου Κόσμου ανήκουν στο γένος *Lutzomyia*.

Παλαιός Κόσμος:

Ph. duboscqi: Βόρεια Αφρική και Αραβία.³⁶

Ph. papatasi: Μεσόγειος, Δυτική Ασία, Βόρεια Αφρική και Αραβία.^{36,37}

Ph. salehi: Βορειοδυτική Ινδία και Ιράν.⁴⁰

Ph. causicus: Καύκασος και Δυτική Ασία.³⁶

Ph. sergenti: Μεσόγειος, Δυτική Ασία, Βόρεια Αφρική (Μαρόκο) και Αραβία.^{36,38}

Ph. similis: Περιοχή των Βαλκανίων, Νότια Αδριατική, Μάλτα και Αιγαίο Πέλαγος.⁴⁶

Ph. alexandri: Αφρική (Αλγερία, Αίγυπτος, Αιθιοπία, Μαρόκο, Τυνησία, Σουδάν), Νότια Ευρώπη (Ελλάδα, Κύπρος, Ισπανία, Ρουμανία), Ασία (Τουρκία, Υεμένη, Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, Σαουδική Αραβία, Ιορδανία, Ισραήλ, Καζακστάν, Ιράκ, Κουβέιτ, Ιράν, Αφγανιστάν, Πακιστάν, Τουρκμενιστάν, Μογγολία, Κίνα, Ινδία).⁴¹

Ph. celiæ: Κένυα.³⁶

Ph. martini: Κένυα, Αιθιοπία και Σουδάν.³⁶

Ph. vansomerenæ: Κένυα.³⁶

Ph. rossi: Αφρική (Ναμίμπια).⁴⁰

Ph. ansarii: Ιράν.⁴⁰

Ph. ariasi: Μεσόγειος (Γαλλία, Ισπανία, Ιταλία, Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία) και Πορτογαλία.^{36,39}

Ph. kandelakii: Δυτική Ασία (Λίβανος, Τουρκία, Ιράν, Αφγανιστάν) και Καύκασος.^{36,40}

Ph. langeroni orientalis: Αφρική (Σουδάν, Αιθιοπία, Κένυα, Τσαντ, Νιγηρία), Νότια Αραβία και Ισπανία.^{36,40}

Ph. longicuspis: Βόρεια Αφρική και Ισπανία.^{36,40}

Ph. longipes: Αιθιοπία και Σουδάν.³⁶

Ph. syriacus: Ισραήλ, Ιορδανία και Συρία.^{40,41,42}

Ph. perfilievi: Μεσόγειος (Ιταλία, Μάλτα, Κύπρος, Ελλάδα, Γιουγκοσλαβία), Ισραήλ, Μαρόκο, Αλγερία και Τυνησία.^{40,41,42}

Ph. neglectus: Ανατολική Μεσόγειος.⁴⁰

Ph. smirnovi: Κίνα, Καζακστάν.⁴⁰

Ph. transcausicus: Αζερμπαϊτζάν.⁴⁰

Ph. guggisbergi: Κένυα.⁴⁰

Ph. aculaetus: Κένυα.⁴⁰

Ph. perniciosus tobbi (ή *Ph. perniciosus* ή *Ph. tobbi*): Μεσόγειος (Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία, Μάλτα, Κύπρος, Γιουγκοσλαβία), Πορτογαλία, Καύκασος, Ιράν, Τουρκία, Συρία και Αφρική (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία, Λιβύη).^{40,41,42}

Ph. pedifer: Κένυα και Αιθιοπία.⁴⁷

Ph. chinensis chinensis: Κίνα.³⁶

Ph. c. halepensis: Καύκασος, Ιράν και Συρία.³⁶

Ph. c. longiductus: Βόρεια Αφρική, Κεντρική Ασία (Ουζμπεκιστάν, Πακιστάν) και Βόρεια Ινδία.^{36,40}

Ph. simici: Νοτιοανατολική Ευρώπη και Δυτική Ασία.³⁶

Ph. balcanicus: Γεωργία, Ελλάδα, Ρουμανία, Ουκρανία, Γιουγκοσλαβία, στο Αζερμπαϊτζάν, στο Ιράν και στην Τουρκία.

Ph. argentipes: Ινδία, Βιρμανία, Μαλαισία, Ταϊλάνδη, Βιετνάμ και Πακιστάν.^{36,10}

Ph. mascittii: Δυτική Ευρώπη και Βόρεια Αφρική.⁴⁵

Ph. canaaniticus: Εγγύς Ανατολή.⁴⁵

Ph. economidesi: Κύπρος.⁴⁵

Νέος Κόσμος:

Lu. longipalpis: Κεντρική και Νότια Αμερική (Μεξικό, Ελ Σαλβαδόρ, Νικαράγουα και Βραζιλία, Βολιβία, Παραγουάη, Αργεντινή).^{36,48}

Lu. renei: Βραζιλία.³⁶

Lu. cruciata: Κεντρική Αμερική (Γουατεμάλα) και Η.Π.Α (Φλόριντα).^{36,48}

Lu. gomezi: Κεντρική Αμερική (Παναμάς), Βενεζουέλα, Γαλλική Γουιάνα, Εκουαδόρ και Βραζιλία.^{36,48}

Lu. migonei: Νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Βραζιλία, Παραγουάη, Αργεντινή).³⁶

Lu. sanguinaria: Κεντρική Αμερική (Κόστα Ρίκα, Ονδούρα, Παναμάς).³⁶

Lu. anduzei: Κεντρική και Νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Γαλλική Γουιάνα, Βραζιλία).³⁶

Lu. flaviscutellata: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Γαλλική Γουιάνα, Βολιβία, Κολομβία, Παραγουάη, Εκουαδόρ).^{36,48}

Lu. intermedia: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Παραγουάη, Αργεντινή).³⁶

Lu. olmeca: Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Γουατεμάλα, Κόστα Ρίκα, Ονδούρα) και Βόρεια Αμερική (Η.Π.Α.).^{36,48}

Lu. trapedoi: Κεντρική και Νότια Αμερική (Ονδούρα, Κόστα Ρίκα, Παναμάς και Κολομβία, Εκουαδόρ).^{36,48}

Lu. whitmani: Νότια Αμερική (Γαλλική Γουιάνα, Βραζιλία, Παραγουάη, Περού).^{36,48}

Lu. ylephiletor: Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Γουατεμάλα, Νικαράγουα).^{36,48}

Lu. wellcomei: Νότια Αμερική (Βραζιλία).⁴⁰

Lu. panamensis: Κεντρική (Παναμάς, Νικαράγουα, Μεξικό) και Νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Κολομβία, Βραζιλία, Περού).^{36,48}

Lu. fisceri: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Παραγουάη).³⁶

Lu. pessoai: Νότια Αμερική (Βραζιλία, Παραγουάη).³⁶

Ελλάδα:

Οι πιο σημαντικοί φορείς στην Ελλάδα είναι οι *Ph. neglectus*, *Ph. perfilievi*, *Ph. tobbi*, *Ph. similis* και *Ph. papatasi*.⁴⁰ Άλλα είδη που επίσης συναντώνται στη χώρα

είναι τα *Ph. alexandri*, *Ph. balcanicus* και *Ph. mascittii*, ενώ έχουν βρεθεί και κάποια είδη *Sergentomyia* (*S. minuta*, *S. Dentata*)⁴⁹, τα οποία θεωρούνται πιθανοί φορείς. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) φαίνεται και η αναλυτική κατανομή των ειδών αυτών στην Ελλάδα.

Πίνακας 2: Κατανομή της σκνίπας στην Ελλάδα.⁴⁹

Είδος σκνίπας	Περιοχή
<i>Ph. neglectus</i>	Δράμα, Πιερία, Αττική, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος
<i>Ph. perfilievi</i>	Δράμα, Κιλκίς, Γιαννιτσά, Λάρισα, Φάρσαλα, Μαγνησία, Αττική, Κεφαλλονιά, Ρόδος, Σάμος
<i>Ph. tobbi</i>	Ξάνθη, Καβάλα, Πιερία, Λάρισα, Φάρσαλα, Αττική, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Ρόδος, Σάμος
<i>Ph. similis</i>	Κομοτηνή, Πιερία, Λάρισα, Κρήτη, Ρόδος, Σάμος
<i>Ph. papatasi</i>	Κομοτηνή, Λάρισα, Μαγνησία, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος
<i>Ph. alexandri</i>	Κομοτηνή, Λάρισα, Σάμος
<i>Ph. balcanicus</i>	Κιλκίς, Λάρισα
<i>Ph. mascittii</i>	Κρήτη
<i>S. minuta</i>	Κομοτηνή, Ξάνθη, Καβάλα, Κιλκίς, Πιερία, Λάρισα, Φάρσαλα, Μαγνησία, Αττική, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος
<i>S. dentata</i>	Λάρισα, Κεφαλλονιά, Κρήτη, Σάμος

Σύμφωνα με τη μελέτη των Ivonic, Patakakis, Tselentis, Chaniotis (2007), οι φορείς (αποδεδειγμένοι ή πιθανοί) με την ευρύτερη εξάπλωση στην Ελλάδα είναι οι *Ph. perfilievi* και *Ph. tobbi*.⁴⁹

Ξενιστής – Δεξαμενή:

Οι περισσότερες λείσμανιάσεις είναι ζωνοόσοι και οι ξενιστές τους μπορεί να είναι ποικίλα είδη θηλαστικών, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μακρά περίοδο διατήρησης της *Leishmania* στη φύση.⁵¹ Ο οργανισμός-ξενιστής μπορεί να είναι ένα άγριο ή οικόσιτο θηλαστικό ή ακόμη και ένας άνθρωπος. Συνήθως, οι οργανισμοί αυτοί είναι καλά προσαρμοσμένοι με τη *Leishmania* και αναπτύσσουν μόνο ήπιες λοιμώξεις, οι οποίες μπορεί να επιμείνουν για πολλά χρόνια. Σημαντική εξαίρεση αποτελούν οι σκύλοι στους οποίους αναπτύσσεται μια γενικευμένη και θανατηφόρος ασθένεια.¹

Οι ξενιστές περιλαμβάνονται σε επτά διαφορετικές τάξεις θηλαστικών. Τα τρωκτικά, το ύραξ (hyrax ή προκαβία), τα μαρσιποφόρα και τα ζώα που ανήκουν στην τάξη *Edentata* (βραδύπους, μυρμηγκοφάγος, κ.α.) είναι ξενιστές της άγριας λείσμανιάσης. Ο σκύλος θεωρείται επί του παρόντος ως ο πραγματικός ξενιστής των *L. infantum* και *L. peruviana* και ο άνθρωπος αναγνωρίζεται συνήθως ως ξενιστής των *L. donovani* και *L. tropica*.¹

Οι σκύλοι είναι οι πιο σημαντικοί ξενιστές του παρασίτου. Είναι οι κυρίως υπεύθυνοι για τη διατήρηση της λείσμανιάσης τόσο των σκύλων όσο και των ανθρώπων σε πολλές ενδημικές περιοχές. Παρά το γεγονός ότι έχουν βρεθεί και άλλα ζώα να έχουν μολυνθεί (τρωκτικά, μαρσιποφόρα, κ.α.) ή να είναι οροθετικά, φαίνεται απίθανο να μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτελεσματικοί ξενιστές-δεξαμενές.⁵²



Εικόνα 6⁹⁷: Σκύλος προσβεβλημένος από *Leishmania*

Αυτή η αποτελεσματικότητα των σκύλων οφείλεται σε τρεις λόγους: α) στην πολύ μακρά περίοδο πριν την εμφάνιση της ασθένειας, β) στην υψηλή συγκέντρωση παρασίτων σε αμαστιγωτή μορφή στο δέρμα και γ) στο υψηλό ποσοστό υποτροπών σε συνάρτηση με την αβέβαιη παρασιτολογική αποστείρωση μετά τη θεραπεία.⁵²

Περισσότερο από το 50% των σκύλων που είναι αποδεδειγμένα μολυσμένοι με το παράσιτο, είναι φαινομενικά υγιείς (ασυμπτωματικοί φορείς). Είτε βρίσκονται σε εκείνο το στάδιο εξέλιξης της νόσου όπου δεν έχουν ακόμη εμφανιστεί τα συμπτώματα ή παρουσιάζουν αυτόματη ίαση (οι σκύλοι που ανήκουν στην τελευταία κατηγορία θεωρούνται ανθεκτικοί στη νόσο). Οι σκύλοι της πρώτης κατηγορίας παρά το γεγονός ότι είναι ασυμπτωματικοί, είναι ικανοί να μολύνουν όποια σκνίπα τους τσιμπήσει. Τέλος, υπάρχει και μια τρίτη κατηγορία σκύλων, οι οποίοι ίσως να μην παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα ή αναπτύσσουν μόνο κάποια δερματικά εξογκώματα στην περιοχή του τσιμπήματος. Αυτό μπορεί να συμβεί λόγω του

διαφορετικού τύπου κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης που διαθέτει κάθε σκύλος.⁵²

Μελέτες δείχνουν πως δεν υπάρχει καμία προδιάθεση για τη νόσο μεταξύ των σκύλων διαφόρων ηλικιών ή φύλου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί η προδιάθεση όσον αφορά τη ράτσα του σκύλου, καθώς οι ράτσες Boxer και Cocker εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο σε σχέση με άλλες.¹⁰³ Τέλος, έχει βρεθεί ότι οι σκύλοι με κοντό τρίχωμα έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου σε σχέση με εκείνους που το τρίχωμά τους είναι πιο μακρύ.

Μορφές της Λεισμανίασης των σκύλων:

Οι δύο βασικές μορφές της νόσου στους σκύλους είναι η σπλαχνική και η δερματική λεισμανίαση. Η διάκριση μεταξύ των δύο μορφών είναι σχετικά δύσκολη σε σύγκριση με τους ανθρώπους καθώς η σπλαχνική λεισμανίαση των σκύλων εμπεριέχει και συμπτώματα της δερματικής μορφής.

Δερματική:

Η δερματική μορφή της νόσου περιλαμβάνει συμπτώματα όπως: αλλοιώσεις του δέρματος, αλωπεκία (απώλεια των τριχών) και ελκωτική ή αποφολιδωτική δερματίτιδα. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από την σχετικά αργή ανάπτυξη μονών ή πολλαπλών δερματικών οζιδίων ή ελκών τα οποία συνήθως επουλώνονται αυθόρμητα μετά από κάποιους μήνες. Οι αλλοιώσεις της νόσου χαρακτηρίζονται από τη διείσδυση μακροφάγων στο δέρμα. Μαζί με τα μακροφάγα πραγματοποιείται και διείσδυση λεμφοκυττάρων, κυττάρων του πλάσματος και πιο σπάνια ηοσινόφιλων ενώ μέσα στα μακροφάγα βρίσκεται μεγάλος αριθμός παρασίτων. Οι δερματικές αλλοιώσεις, που παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, περιβάλλονται από συνδετικό ιστό (ινοβλάστες), με αποτέλεσμα να αποκτούν την εμφάνιση κοκκιώματος (μικρός όγκος στρογγυλού σχήματος).⁵³

Σπλαχνική:

Η σπλαχνική λεισμανίαση εμφανίζεται ως προοδευτική εξάντληση του ζώου και απώλεια βάρους με ή χωρίς μείωση της όρεξης (ανορεξία), ενώ είναι πιθανή και η εμφάνιση δερματικών αλλοιώσεων. Τα πιο συχνά κλινικά συμπτώματα είναι η λεμφαδενομεγαλία (ενός ή περισσότερων λεμφαδένων) και η σπληνομεγαλία. Οι δερματικές αλλοιώσεις είναι γενικά μη κνησμώδεις και χαρακτηρίζονται από ξηρή αποφολιδωτική δερματίτιδα με αλωπεκία (τριχόπτωση) στην περιοχή του κεφαλιού (αυτιά, μύτη, βλέφαρα), της ράχης και ενίοτε σε όλο το σώμα. Σε περιπτώσεις σκύλων με χρόνια λεισμανίαση, που δεν έχουν δεχθεί θεραπεία, οι επαναλαμβανόμενες δερματικές μολύνσεις μπορούν να οδηγήσουν σε χαρακτηριστική πάχυνση του δέρματος. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η ονυχογρύπωση, που είναι στην ουσία η ανώμαλη ανάπτυξη των νυχιών. Στο 40% των προσβεβλημένων σκύλων παρατηρούνται δερματικές εξελκώσεις, οι οποίες κατανέμονται, συνήθως, στα άκρα, στην παρυφή του πτερυγίου του αυτιού και στη θαλάμη της μύτης (ρουθούνι) ή σε οποιαδήποτε άλλη βλεννογονική μεμβράνη (π.χ. στόμα, γεννητικά όργανα). Είναι, επίσης, πιθανή και η παρουσία μη εξελκωμένων οζιδίων με διάμετρο

1-10 cm, τα οποία περιέχουν μεγάλο αριθμό παρασίτων στη αμαστίγωτη μορφή. Συχνά, οι μεμβράνες των βλεννογόνων είναι ωχρές (εξαρτάται από το βαθμό της αναιμίας) ή καστανοκόκκινες (ως αποτέλεσμα ηπατονεφρικής βλάβης).⁵⁴

Ένα μικρότερο ποσοστό προσβεβλημένων σκύλων εμφανίζει οφθαλμικές αλλοιώσεις, από απλή βλεφαρο-επιπεφυκίτιδα μέχρι και σοβαρή πανοφθαλμίτιδα. Συνήθως, στα οφθαλμικά αυτά συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται και βλάβες του πρόσθιου τμήματος του ματιού (κερατοειδής επιπεφυκίτιδα και φλεγμονή ίριδας), οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε γλαύκωμα λόγω απόφραξης της κόρης.^{55,56}

Ένα ακόμη σύμπτωμα της νόσου είναι η επίσταξη (αιμορραγία από το βλεννογόνο των ρινικών κοιλοτήτων), που είναι συνήθως μονόπλευρη και ασυνεχής και προκαλείται από μεγάλο βαθμού θρομβοκυτταροπενία ή τοπική εξέλκωση του βλεννογόνου της ρινικής κοιλότητας. Επίσης, κάποιοι προσβεβλημένοι σκύλοι παρουσιάζουν χωλότητα σε ένα ή περισσότερα άκρα, που προκαλείται από πολυμυοσίτιδα ή ανοσολογική πολυαρθρίτιδα. Η ψηλάφηση της διάφυσης των μακριών οστών των σκύλων παράγει πόνο, το ίδιο και η κάμψη ή η έκταση των άκρων. Αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας παρασίτων στις αρθρώσεις.^{57,58}

Η πολυουρία και η πολυδιψία είναι δύο ακόμη συμπτώματα της σπλαχνικής λεϊσμανίασης που οφείλονται στη βλάβη των νεφρών. Η νεφρική βλάβη μπορεί, επίσης, να προκαλέσει περιφερικό οίδημα, πρωτεϊνουρία και αυξημένα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης στον ορό.⁵⁹ Πιο σπάνια συμπτώματα είναι η χρόνια κολίτιδα, που προκαλείται από τη διήθηση λεμφοπλασμοκυττάρων, ιστοκυττάρων και αμαστιγωτών στο κολικό βλεννογόνο⁶⁰ και η χρόνια ηπατίτιδα, που προκαλείται από τη διήθηση πλούσιων σε αμαστιγώτες μακροφάγων στο ήπαρ του προσβεβλημένου σκύλου.⁶¹ Τέλος, έχουν αναφερθεί και κάποιες περιπτώσεις σκύλων με σπλαχνική λεϊσμανίαση, οι οποίοι εμφάνισαν φλεγμονή του μυοκαρδίου λόγω της διήθησης σε αυτό μεγάλου αριθμού μονοπύρηνων κυττάρων με αποτέλεσμα την ατροφία και τον εκφυλισμό του.⁶² Αυτή η μορφή της νόσου εμφανίζεται πιο συχνά στους σκύλους και είναι και η πιο επικίνδυνη.



Αλωπεκία



Θυροχρόνωση



Ξηρό δέρμα γύρω από μάτια, αυτιά και μύτη



Επίσταξη



Φλεγμονή ματιού

Εικόνα 7^{78,79}: Συμπτώματα σπλαχνικής λεϊσμανίασης σε σκύλους.

Παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό της έκφρασης των συμπτωμάτων και το μέγεθος της μόλυνσης:

Ο βαθμός της έκφρασης των συμπτωμάτων εξαρτάται από τον τύπο της ανοσολογικής αντίδρασης, που θα ενεργοποιηθεί μετά τη μόλυνση του σκύλου.

Έχει βρεθεί ότι το παράσιτο, πιθανόν, προσβάλλει και τα κύτταρα Langerhans, καθώς και άλλα δενδριτικά κύτταρα.⁶³ Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα του παρασίτου (αντιγονοπαρουσιαστικά) και προσελκύουν κύτταρα Th (T helper ή βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα) τα οποία και οδηγούν στο σημείο της μόλυνσης. Οι περιπτώσεις σκύλων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη *Leishmania* οφείλονται στην ισχυρή T-λεμφοκυτταρική απόκριση τύπου 1 (Th1), η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή κυτοκινών, όπως η ιντερφερόνη-γ (IFNγ), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), η ιντερλευκίνη 2 (IL2) και η ιντερλευκίνη 12 (IL12). Οι κυτοκίνες αυτές ενεργοποιούν την κυτταρική ανοσία, η οποία έχει την ικανότητα να εξαλείψει τη μόλυνση. Οι σκύλοι, που εμφανίζουν ισχυρή Th1 απόκριση, πιθανόν να είναι παροδικά οροθετικοί ή να διατηρούν τα παράσιτα περιορισμένα μέχρι την πλήρη εξάλειψή τους.⁶⁴

Η δεύτερη περίπτωση σκύλων εμφανίζει T-λεμφοκυτταρική απόκριση τύπου 2 (Th2), στην οποία παράγονται οι ιντερλευκίνες IL4, IL5, IL6 και IL10. Οι ιντερλευκίνες αυτές προάγουν τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν αντισώματα κατά του παρασίτου (χυμική ανοσία). Όμως τα αντισώματα αυτά συμβάλλουν ελάχιστα στην αντιμετώπιση της πρωτοζωικής λοίμωξης. Μπορούν μάλιστα να γίνουν ακόμη και επιζήμια για τον οργανισμό του σκύλου, καθώς σχηματίζουν ανοσοσύμπλοκα, τα οποία εναποτίθενται στις βασικές μεμβράνες. Η οψωνινοποίηση των παρασίτων μέσω της χυμικής ανοσίας μπορεί, ακόμη, να αυξήσει τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα και να οδηγήσει σε επιπλέον μόλυνσή τους με παράσιτα.⁶⁵ Το σύστημα της κυτταρικής ανοσίας των ευαίσθητων σκύλων είναι εξασθενημένο. Τα λεμφοκύτταρα των σκύλων αυτών εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού στην *in vitro* έκθεση σε αντιγόνα *Leishmania*.^{66,67}

Οι προσβεβλημένοι σκύλοι μπορεί να εμφανίσουν ένα από τα δύο πρότυπα απόκρισης, δηλαδή, είτε αναπτύσσουν προοδευτική νόσο, που μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο, είτε παραμένουν ασυμπτωματικοί. Στην πραγματικότητα, μετά τη μόλυνση ενεργοποιούνται και οι δύο τύποι ανοσίας (Th1 και Th2), με αποτέλεσμα η μεταβλητότητα στην εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων αλλά και η σοβαρότητα της ασθένειας να εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των δυο συστημάτων.⁶⁶

Η περίοδος επώασης πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων μπορεί να διαρκέσει από ένα μήνα μέχρι και επτά χρόνια. Σε αυτή την περίοδο πραγματοποιείται ευρεία εξάπλωση των παρασίτων με προτίμηση το μυελό των οστών, τους λεμφαδένες, το σπλήνα και το συκώτι.

Η ζημιά που θα προκαλέσει το παράσιτο εξαρτάται από δύο παράγοντες:

1) την απευθείας δράση του παρασίτου στους ιστούς, που οδηγεί στο σχηματισμό μη πυωδών αλλοιώσεων του δέρματος, του ήπατος, του εντέρου, των νεφρών, των ματιών και των οστών,

2) την έμμεση βλάβη λόγω της εναπόθεσης των ανοσοσυμπλόκων στις αρθρώσεις και στις βασικές μεμβράνες των νεφρών, των αγγείων και των ματιών, που οδηγεί σε αγγειίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα και πολυαρθρίτιδα.^{61.68}

Ένας ακόμη παράγοντας, που φαίνεται πως επηρεάζει το βαθμό της μόλυνσης του παρασίτου έναντι του ξενιστή, είναι κάποια συστατικά του *σίου της σκνίπας*. Τα είδη της σκνίπας, στα οποία έχει μελετηθεί αυτή η ιδιότητα, είναι κυρίως η *Lutzomyia longipalpis* και λιγότερο η *Ph. papatasi*.

Αρχικά, βρέθηκε ότι η μόλυνση εργαστηριακών ποντικών με έναν αριθμό παρασίτων *L. major* (όμοιο με τον αριθμό που μεταδίδει με το τσίμπημα της η σκνίπα *Lutzomyia longipalpis*, (10-100 παράσιτα), οδηγεί στην επιβίωση των παρασίτων μέσα στο ζώο, μόνο εφόσον αυτά είχαν ενεθεί μαζί με σίο της σκνίπας.⁴³ Το γεγονός αυτό δεν οφείλεται στην απευθείας επιρροή του σίου της σκνίπας στο παράσιτο, αλλά σε ένα είδος επίδρασης στον ίδιο τον ξενιστή.⁵⁰ Στη φύση, το τσίμπημα μια μολυσμένης σκνίπας οδηγεί στην απελευθέρωση στο δέρμα του ξενιστή παρασίτων μαζί με σίο. Αργότερα βρέθηκε ένα συστατικό του σίου της *Lu. longipalpis*, που ονομάζεται *maxadilan* και έχει την ικανότητα να οξύνει τη μόλυνση από την *L. major* και να παρατείνει την επιβίωση του παρασίτου στον ξενιστή. Συγκεκριμένα, αναστέλλει την παραγωγή της IFN-γ και της υπομονάδας IL-12p40 και επάγει την παραγωγή IL-6 από τα διεγερμένα από την *L. major* μακροφάγα.¹⁵² Το γεγονός αυτό πιθανόν να οδηγεί σε αναστολή της κυτταρικής ανοσίας, η οποία ενεργοποιείται από την IFN-γ, και επαγωγή της χυμικής ανοσίας, που ενεργοποιείται από την IL-6. Ευνοείται, δηλαδή, η T-λεμφοκυτταρική απόκριση τύπου 2, η οποία ενισχύει την πρόοδο της ασθένειας (reviewed by Rogers et al. 2002a).¹⁵³

Αντίστοιχες μελέτες για τη *L. braziliensis* και τη *L. amazonensis* έδειξαν ότι ο σίος της *Lu. longipalpis* ενισχύει τη μόλυνση του ξενιστή και από αυτά τα είδη του παρασίτου. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο δρα είναι διαφορετικός και φαίνεται να εμπλέκει την IL-4 για τη *L. braziliensis*¹⁵⁴ (η οποία έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση της IFN-γ στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας) και την IL-10 για τη *L. amazonensis*.¹⁵⁵

Όσον αφορά τη *Ph. papatasi*, η οποία είναι και ο φυσικός φορέας της *L. major*, φαίνεται πως και αυτή ενισχύει τη μόλυνση του ξενιστή από το είδος αυτό του παρασίτου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο σίος της *Ph. papatasi*, αναστέλλει την έκφραση της iNOS (συνθάση του NO) και επομένως την παραγωγή του NO στα μολυσμένα μακροφάγα *in vitro*¹⁵⁶ αλλά και *in vivo*.¹⁵⁷ Με τον τρόπο αυτό, πιθανώς μειώνεται η μικροβιοκτόνος δράση των μακροφάγων και προωθείται ο πολλαπλασιασμός των παρασίτων στο εσωτερικό των κυττάρων αυτών. Το συστατικό του σίου της *Ph. papatasi*, που παρεμβαίνει στην ικανότητα των μακροφάγων να καταστρέψουν το παράσιτο, φαίνεται πως είναι η αδενοσίνη.¹⁵⁸

Διάγνωση της νόσου

Η διάγνωση της λείσμανίασης στους σκύλους είναι αρκετά δύσκολη εξαιτίας τριών βασικών λόγων⁵³:

- 1) Τα κλινικά συμπτώματα είναι ποικίλα και μπορεί να μοιάζουν με τα συμπτώματα άλλων ασθενειών.
- 2) Η ιστοπαθολογία της νόσου είναι εξαιρετικά μη-ειδική και πιθανόν να μοιάζει με εκείνη άλλων μολυσματικών ή ανοσο-διαμεσολαβούμενων ασθενειών.

3) Μέχρι στιγμής, δεν είναι διαθέσιμο κανένα διαγνωστικό τεστ που να διαθέτει 100% εξειδίκευση αλλά και ευαισθησία.

Η διάγνωση μπορεί μεν να γίνει με βάση τα κλινικά συμπτώματα, όμως απαιτείται και η επιβεβαίωση μέσω των τεχνικών διάγνωσης. Οι βασικές διαγνωστικές τεχνικές είναι τρεις:

1. Παρασιτολογικές τεχνικές:

Στόχος των τεχνικών αυτών είναι η οπτικοποίηση του παρασίτου. Έχουν εξειδίκευση 100%, όμως ο βαθμός ευαισθησίας είναι συνήθως χαμηλός. Η ταυτοποίηση των παρασίτων από κυτταρολογικά παρασκευάσματα που προέρχονται από τους λεμφαδένες ή το μυελό των οστών, είναι αρκετά γρήγορη και εύκολη. Τα κυτταρολογικά επιχρίσματα βάφονται με χρωστική May-Gruenewald-Giemsa και τα παράσιτα εμφανίζονται ως μικρά ωοειδή σώματα (2-6μm) με έναν σκούρο πυρήνα και έναν μικρό κινητοπλάστη σε κάθετη θέση.⁶⁹ Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν έχει παρατηρηθεί κανενός είδους συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των παρασίτων που ανιχνεύονται στα κυτταρολογικά επιχρίσματα και της σοβαρότητας της νόσου.⁶⁹ Παράσιτα *Leishmania* μπορούν, επίσης, να παρατηρηθούν σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα που προέρχονται από κρούστες ή φολίδες ή ακόμη και από δερματικά οζίδια. Η ευαισθησία των τεχνικών αυτών για τη διάγνωση της λεισμανίασης στους σκύλους είναι χαμηλή. Μόνο το 50-70% των επιχρισμάτων μυελού από μολυσμένους σκύλους δίνουν θετικό αποτέλεσμα, ενώ όσον αφορά τα επιχρίσματα λεμφαδένων, θετικό είναι μόνο το 30% των περιπτώσεων.^{54,70}

Τα παράσιτα μπορούν, επίσης, να παρατηρηθούν σε τμήματα ιστού βαμμένα με τη χρωστική αιματοξυλίνης-ηοσίνης ή με Giesma. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία αυτών των μεθόδων έχουν αναπτυχθεί ανοσοϊστοχημικές και ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές οι οποίες επιτυγχάνουν την επιλεκτική αναγνώριση του παρασίτου με χρώση ανοσοϋπεροξειδάσης.⁷¹

2. Ορολογικές δοκιμές:

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες ορολογικές δοκιμές που μετρούν τα αντισώματα της κυκλοφορίας του αίματος. Η έμμεση δοκιμή ανοσο-φθορισμού (IFAT), η Dot-ELISA και η άμεση δοκιμή οροσυγκόλλησης (DAT) είναι κάποιες από τις δοκιμές που κυκλοφορούν στην αγορά.^{67,72-75} Η ευαισθησία και η εξειδίκευση αυτών των τεχνικών είναι συνήθως υψηλή (80-100%). Το πρόβλημα είναι ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοναδικές τεχνικές για τη διάγνωση της νόσου, καθώς πιθανόν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα για κάποιους υγιείς, ανθεκτικούς σκύλους, οι οποίοι είχαν έλθει κάποια στιγμή στο παρελθόν σε επαφή με το παράσιτο. Παράλληλα, μπορούν να προκύψουν και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για μολυσμένους σκύλους που δεν έχουν ακόμη αναπτύξει αντισώματα (προσυμπτωματικό στάδιο).^{69,73} Επιπλέον, τα επίπεδα των αντισωμάτων του ορού δεν είναι ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου,^{73,75} ενώ είναι και ακατάλληλα ως μέσο ελέγχου της αποτελεσματικότητας του θεραπευτικού σχήματος, καθώς μπορεί να παραμένουν ανιχνεύσιμα στον ορό ακόμη και μετά την ίαση του ζώου.⁷⁰

3. Μοριακές μέθοδοι:

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ένα διαγνωστικό τεστ με υψηλή ευαισθησία αλλά και εξειδίκευση.⁷⁶ Το DNA του κινητοπλάστη (kDNA) του παρασίτου μπορεί επιλεκτικά να ενισχυθεί από τους ιστούς του ήπατος, του σπλήνα, του δέρματος, των λεμφαδένων και του μυελού των οστών.⁷⁰ Η τεχνική αυτή έχει την

ικανότητα να ανιχνεύει την ύπαρξη παρασίτων ακόμη και σε σκύλους, που έχουν θεραπευθεί εδώ και χρόνια, αλλά και σε αυτούς που δίνουν ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα στις ορολογικές εξετάσεις.⁷⁷

Θεραπεία

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της λεισμανίασης των σκύλων επιτρέπουν την καλή ανάρρωση των περισσότερων ζώων, όμως σπάνια μειώνουν τις περιπτώσεις υποτροπών.⁶¹ Η μέτρια θεραπευτική τους επιτυχία αποδίδεται στις ανοσολογικές μεταβολές, που συμβαίνουν σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια του κύκλου της μόλυνσης. Επίσης, η παρουσία κυττάρων μολυσμένων με παράσιτα σε ιστούς που δεν αιματώνονται καλά (π.χ. δέρμα, κερατινώδεις ιστοί, υαλώδες σώμα) κάνει ακόμη πιο δύσκολη την επίτευξη αποτελεσματικής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των φαρμάκων. Ο έλεγχος της λεισμανίασης γίνεται περαιτέρω περίπλοκος λόγω της συχνής εμφάνισης στελεχών *Leishmania* ανθεκτικών σε κάποια από τα φάρμακα.

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο φάρμακο είναι τα **σκευάσματα αντιμονίου**. Συγκεκριμένα, εδώ και αρκετά χρόνια χρησιμοποιούνται πεντασθενείς ενώσεις του αντιμονίου για τη θεραπεία της σπλαχνικής αλλά και της δερματικής λεισμανίασης των σκύλων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχώς αυξανόμενη εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών *Leishmania* στο συγκεκριμένο φάρμακο.^{80,89}

Το πρώτο φάρμακο, που χρησιμοποιήθηκε ως αντιλεισμανιακό στην κτηνιατρική πράξη, είναι η **αλλοπουρινόλη**.⁸² Το φάρμακο αυτό ασκεί ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του παρασίτου παρεμβαίνοντας στη σωστή σύνθεση των πρωτεϊνών.⁸¹ Η δράση της, δηλαδή, είναι παρασιτοστατική και όχι παρασιτοκτόνος.

Η **αμινοσιδίνη** είναι ένα ακόμη φάρμακο που έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της σπλαχνικής λεισμανίασης των σκύλων κυρίως στις περιπτώσεις εκείνες που το παράσιτο εμφανίζει ανθεκτικότητα σε άλλα φάρμακα.⁸³

Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και ένα φάρμακο με αντιπρωτοζωικές και αντιμυκητιακές ιδιότητες, η **πενταμιδίνη**, η οποία φαίνεται πως έχει την ικανότητα να προκαλεί βλάβες στο DNA της *Leishmania*.⁸⁴ Το πρόβλημα με τη χρήση της πενταμιδίνης στους σκύλους είναι ότι έχει πολλές και σοβαρές παρενέργειες, για το λόγο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται με πολύ μεγάλη προσοχή.⁸⁵

Η **αμφοτερικίνη Β** είναι ένα φάρμακο με ευρεία δράση. Είναι περίπου 400 φορές πιο ισχυρό από τα αντιμονιακά παρασκευάσματα, όμως δεν επιλέγεται συνήθως για τη θεραπεία της λεισμανίασης των σκύλων εξαιτίας των τοξικών παρενεργειών που έχει κυρίως στους νεφρούς.⁸⁶ Η χρήση του φαρμάκου αυτού γίνεται μόνο σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε άλλα φάρμακα.

Τέλος, οι **ιμιδαζόλες** (κετοκοναζόλη και μετρονιδαζόλη), που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία της ανθρώπινης λεισμανίασης, έχουν δείξει κάποια θετικά σημάδια και στη θεραπεία των σκύλων. Ωστόσο, η χρήση τους περιορίζεται λόγω των συχνών παρενεργειών που παρουσιάζονται και θα πρέπει να γίνουν πολλές ακόμη έρευνες για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί και στους σκύλους.^{87,88}

Πρόληψη και έλεγχος:

Η πρόληψη και ο έλεγχος της λεισμανίασης των σκύλων μπορεί να επιτευχθεί μέσω του ελέγχου των φορέων της και με τη λήψη μέτρων για την αποφυγή έκθεσης σε αυτούς. Για παράδειγμα, σε ενδημικές περιοχές της νόσου, οι σκύλοι δεν θα πρέπει

να περνούν τη νύχτα εκτός σπιτιού (καθώς οι σκνίπες είναι δραστήριες κυρίως τη νύχτα), ενώ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πλέγματα παραθύρων με πολύ λεπτά ανοίγματα, προκειμένου να μην μπορούν να περάσουν οι σκνίπες στο εσωτερικό του σπιτιού. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η χρήση περιλαίμιου με εντομοαπωθητικό (δελταμεθρίνη), μπορεί να προστατέψει τους σκύλους από το τσίμπημα της σκνίπας και με αυτό τον τρόπο προλαμβάνει τη μόλυνση από το παράσιτο.⁹⁸

Ο εμβολιασμός των σκύλων κατά της *Leishmania* έχει, επίσης, προταθεί για την πρόληψη της νόσου. Το πρόβλημα, που ανακύπτει με τη δημιουργία εμβολίου, οφείλεται στο γεγονός ότι για τα διάφορα είδη *Leishmania* έχουν ταυτοποιηθεί διαφορετικοί μολυσματικοί παράγοντες και υπάρχουν πολύ μεγάλες διαφορές στους μηχανισμούς ανοσολογικής απόκρισης που διαμεσολαβούν στη δημιουργία ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας στη μόλυνση αλλά και στην παθολογία της ασθένειας.⁹⁹ Το 2003 κυκλοφόρησε ένα εμβόλιο (*Leshmune Vaccine*) για την *L. donovani* στη Βραζιλία. Οι μελέτες έδειξαν ότι επετεύχθει πάνω από 87% προστασία, ενώ υπήρχαν και κάποιες παρενέργειες, όπως ανορεξία και τοπικό οίδημα.^{100,101}

Το ιδανικό εμβόλιο για τη *Leishmania* θα πρέπει να είναι ασφαλές, οικονομικό, αποτελεσματικό σε όλα τα είδη του παρασίτου και επίσης αποτελεσματικό και για την πρόληψη αλλά και για τη θεραπεία της νόσου. Τέτοια εμβόλια πιθανόν να αναπτυχθούν στα επόμενα 5-10 χρόνια. Η δυνατότητά τους να χρησιμοποιούνται και για τη θεραπεία της νόσου είναι αρκετά ελκυστική δεδομένων των προβλημάτων που αντιμετωπίζονται (παρενέργειες, κόστος) με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται τώρα.¹⁰²

Τέλος, τα αποτελέσματα των μελετών για την επίδραση του σιέλου της σκνίπας στην οξύτητα της μόλυνσης, λόγω της αλλαγής που επιφέρουν τα συστατικά του στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, οδήγησαν σε μια ενδιαφέρουσα πιθανότητα εμβολιασμού του ξενιστή ενάντια στα συστατικά αυτά. Έχει αποδειχθεί, ότι η προηγούμενη έκθεση των εργαστηριακών ποντικών σε συστατικά του σιέλου, πιθανόν να παρέχει προστασία ενάντια στη μετέπειτα μόλυνση.¹⁵⁹ Πράγματι, η ανοσοποίηση με το αντιγόνο *maxadilan* (συστατικό του σιέλου της *Lu. longipalpis*) παρείχε προστασία στα ποντίκια κατά της μόλυνσης από την *L. major*.¹⁶⁰ Προστασία των ποντικών από την *L. major* επετεύχθει, επίσης, και μετά από εμβολιασμό τους με συστατικά του σιέλου της *Ph. papatasi*.¹⁶¹ Επομένως, ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών του σιέλου της σκνίπας μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση νέων εμβολίων κατά της *Leishmania*.^{162,163} Ωστόσο, ο πολυμορφισμός των πρωτεϊνών αυτών αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα, που ίσως περιορίσει την χρησιμότητα αυτού του είδους των εμβολίων.^{164,165}

Μετάδοση της νόσου:

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μετάδοση της λεισμανίασης των σκύλων γίνεται μέσω των σκνιπών που είναι φορείς του παρασίτου. Αυτός είναι ο βασικός τρόπος μετάδοσης της νόσου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί (ή υποπτευθεί) περιπτώσεις μετάδοσης, στις οποίες δεν συμμετείχαν οι σκνίπες.

Μία τέτοια περίπτωση προτείνει τον πιθανό ρόλο των τσιμπουριών και των ψύλλων στη μετάδοση της νόσου. Η μετάδοση επετεύχθει σε εργαστηριακές συνθήκες, με τη χρήση τσιμπουριών (*Rhipicephalus sanguineus*) και ψύλλων (*Ctenocephalides felis*), που απομονώθηκαν από μολυσμένους με λεισμανίαση σκύλους, σε εργαστηριακά χάμστερ.^{90,91} Ωστόσο, δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί η

μετάδοση της νόσου στους σκύλους μέσω αυτών των αρthropόδων σε φυσικές συνθήκες.

Η κάθετη μετάδοση της σπλαχνικής λεισμανίασης από μία μολυσμένη μητέρα στα κουτάβια της έχει επίσης παρατηρηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες.⁹² Ωστόσο διάφορες έρευνες που έχουν γίνει στη φύση δίνουν συγκεκριμένα αποτελέσματα για τη σημασία αυτού του τρόπου μετάδοσης.^{93,94}

Επιπλέον, έχει προταθεί και η περίπτωση μετάδοσης της νόσου στους σκύλους μέσω μετάγγισης αίματος.⁹⁵ Η απευθείας μετάδοση από σκύλο σε σκύλο μέσω της επαφής έχει επίσης αναφερθεί ότι ίσως συμβαίνει στις Η.Π.Α., σε μία προσπάθεια να εξηγηθεί η εξάπλωση της λεισμανίασης μεταξύ των σκύλων, σε μια περιοχή όπου απουσιάζουν οι αποδεδειγμένοι φορείς αλλά και η ανθρώπινη μόλυνση.⁹⁶

Όλοι οι παραπάνω τρόποι μετάδοσης της νόσου, εκτός αυτής με φορέα τη σκνίπα, θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω, καθώς δεν είναι ακόμη γνωστός ο ρόλος που ίσως παίζουν στην επιδημιολογία της λεισμανίασης των σκύλων.

Επιδημιολογία:

Η λεισμανίαση είναι μία ασθένεια ευρέως κατανομημένη σε όλο τον κόσμο. Το εύρος της ξεκινά από τις τροπικές περιοχές της Αμερικής και της Αφρικής και εκτείνεται σε εύκρατες περιοχές της Νότιας Αμερικής, της Νότιας Ευρώπης και της Ασίας. Τα όρια της έκτασής της έχουν γεωγραφικό πλάτος 45° στο Βορρά και 32° στο Νότο. Η γεωγραφική κατανομή της ασθένειας σχετίζεται σε αρκετά μεγάλο βαθμό με αυτή των ειδών της σκνίπας που δρουν ως φορείς, καθώς επίσης και με την οικολογία τους και τις συνθήκες της εσωτερικής ανάπτυξης του παρασίτου. Η ασθένεια αυτή είναι παρούσα σε 88 χώρες σε όλο τον κόσμο, εκ των οποίων οι 16 είναι βιομηχανοποιημένες και οι 72 αναπτυσσόμενες, ενώ οι 13 από αυτές βρίσκονται μεταξύ των πιο φτωχών χωρών του κόσμου.¹⁰⁴

Σπλαχνική Μορφή:

Η σπλαχνική λεισμανίαση που προκαλείται από την *L. infantum* είναι χωρίς αμφιβολία η πιο σημαντική ζωνόσος, της οποίας ο βασικός ξενιστής-δεξαμενή είναι ο σκύλος. Η *L. infantum* είναι ευρέως διαδεδομένη στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο, δηλαδή τη Ν. Ευρώπη και τη Β. Αφρική, αλλά και στη Δυτική Αφρική. Επίσης, βρίσκεται στη Σαουδική Αραβία και την Υεμένη και εκτείνεται μέσω του Ιράκ του Ιράν και του Πακιστάν μέχρι τη Βορειοδυτική Ινδία και την Κίνα. Οι αποδεδειγμένοι φορείς της λεισμανίασης των σκύλων, που προκαλείται από την *L. infantum* είναι οι *Ph. perniciosus*, *Ph. ariasi*, *Ph. perfilievi*, *Ph. neglectus* και *Ph. langeroni*, ενώ πιθανοί φορείς είναι οι *Ph. chinensis*, *Ph. longiductus*, *Ph. longiscuspis*, *Ph. tobbi*, *Ph. kandelakii*, *Ph. syriacus*, *Ph. smirnovi* και *Ph. transcaucasicus*.^{40,105,106}

Στο Νέο Κόσμο η σπλαχνική λεισμανίαση των σκύλων προκαλείται από την *L. chagasi* (η οποία έχει τελικά αποδειχθεί πως είναι πανομοιότυπη με την *L. infantum*) και συναντάται στην Κεντρική και Νότια Αμερική. Οι αποδεδειγμένοι φορείς της *L. chagasi* (= *L. infantum*) είναι η *Lu. longipalpis* και η *Lu. youngi*, ενώ πιθανοί είναι η *Lu. evansi* και η *Lu. shannoni*.^{40,105,106}

Η *L. amazonensis* έχει βρεθεί να προκαλεί σπλαχνική λεισμανίαση σε σκύλους στη Ν. Αμερική και συγκεκριμένα στη Βραζιλία, ενώ γενικά συναντάται και στη Βολιβία, το Περού και τη Βενεζουέλα. Ωστόσο δεν έχει ακόμη βρεθεί το είδος της σκνίπας, που μεταδίδει την ασθένεια στο σκύλο.¹⁰⁸ Πιθανός φορέας είναι η *Lu. flaviscutellata*.⁴⁰

Δερματική Μορφή:

Ο σκύλος αποτελεί έναν σημαντικό ξενιστή-δεξαμενή και για τη δερματική λεισμανίαση, που προκαλείται από την *L. peruviana*. Αυτό το είδος του παρασίτου συναντάται στην περιοχή των Περουβιανών Άνδεων. Οι φορείς της *L. peruviana* είναι η *Lu. verrucarum* και η *Lu. peruensis*.⁴⁰

Η *L. braziliensis* είναι ένα ακόμη είδος του παρασίτου, που προκαλεί δερματική λεισμανίαση στους σκύλους. Ο σκύλος φαίνεται να μην αποτελεί το βασικό ξενιστή-δεξαμενή για αυτή την ασθένεια. Ωστόσο, το παράσιτο έχει απομονωθεί από οικόσιτους σκύλους σε χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής (Αργεντινή, Βολιβία, Βραζιλία, Κολομβία, Περού, Βενεζουέλα). Οι αποδεδειγμένοι φορείς της *L. braziliensis* είναι η *Lu. wellcomei* και η *Lu. whitmani*.^{40, 107, 109}

Δερματική λεισμανίαση προκαλείται στον σκύλο και από την *L. mexicana* στη Ν. Αμερική και συγκεκριμένα στο Εκουαδόρ, ενώ γενικά συναντάται και στην Κεντρική Αμερική (Μεξικό, Ονδούρα, Γουατεμάλα). Το είδος της σκνίπας, που μεταδίδει την ασθένεια στο σκύλο, είναι η *Lu. ayachuchensis*.¹⁰⁹

Η *L. panamensis* είναι ένα ακόμη είδος, που προκαλεί δερματική λεισμανίαση στον σκύλο. Έχει απομονωθεί από σκύλους στην Κολομβία και το Εκουαδόρ και γενικά συναντάται και σε χώρες της Κεντρικής Αμερικής (Παναμάς, Κόστα Ρίκα, Ονδούρα). Ο φορέας της *L. panamensis* είναι η *Lu. trapidoi*.¹⁰⁹

Η *L. major* έχει απομονωθεί από σκύλους μόνο στη Σαουδική Αραβία ενώ γενικά συναντάται στη Β. Αφρική, την Κεντρική Ασία, την Εγγύς και Μέση Ανατολή και την Ινδία. Ο αποδεδειγμένος φορέας της *L. major* είναι ο *Ph. papatasi*.⁴⁰ Το παράσιτο αυτό, όμως, βρίσκεται κυρίως στα τρωκτικά της ερήμου και προκαλεί επιδημία στους ανθρώπους. Ο σκύλος δεν αποτελεί σημαντικό ξενιστή-δεξαμενή της *L. major*.

Τέλος, η *L. tropica*, που προκαλεί δερματική λεισμανίαση, έχει απομονωθεί από σκύλους στην Ινδία, στο Αφγανιστάν και το Ιράν, ενώ γενικά συναντάται και στις χώρες της Μεσογείου, στη Δυτική και Κεντρική Ασία και στην Κεντρική και Βόρεια Αφρική. Ο αποδεδειγμένος φορέας της *L. tropica* είναι ο *Ph. sergenti*.⁴⁰

Η γεωγραφική κατανομή των διαφόρων παρασίτων *Leishmania* συμπίπτει σε μεγάλο βαθμό με τη γεωγραφική εξάπλωση των ειδών της σκνίπας. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια επιπλέον απόδειξη της δράσης των σκνιπών *Phlebotomus* και *Lutzomyia* στη μετάδοση της λεισμανίασης. Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται η συγκριτική κατανομή των ειδών *Leishmania* που προσβάλλουν τον σκύλο και των ειδών της σκνίπας που αποτελούν αποδεδειγμένους ή πιθανούς φορείς (Πίνακες 3 και 4).

Πίνακας 3: Επιδημιολογία της λεισμανίασης των σκύλων και συγκριτική κατανομή των ειδών *Leishmania* και των ειδών *Phlebotomus* στον Παλαιό Κόσμο.^{40, 105, 106}

Μορφή της νόσου	Είδος παρασίτου	Φορέας (αποδεδειγμένος ή πιθανός)	Γεωγραφική κατανομή
Σπλαχνική	<i>L. infantum</i>	<i>Ph. perniciosus</i> [†] <i>Ph. ariasi</i> [†] <i>Ph. perfilievi</i> [†] <i>Ph. neglectus</i> [†] <i>Ph. langeroni</i> [†] <i>Ph. chinensis</i> [*]	Μεσόγειος Δυτική Μεσόγειος Μεσόγειος Ανατολική Μεσόγειος Β. Αφρική, Ισπανία Κεντρική και Βόρεια Κίνα

		<i>Ph. longiductus</i> [*] <i>Ph. longicuspis</i> [*] <i>Ph. tobbi</i> [*] <i>Ph. kandelakii</i> [*] <i>Ph. syriacus</i> [*] <i>Ph. smirnovi</i> [*] <i>Ph. transcaucasicus</i> [*]	Β. Αφρική, Κεντρική Ασία Β. Αφρική, Ισπανία Ανατολική Μεσόγειος Λίβανος, Τουρκία, Ιράν, Αφγανιστάν Ισραήλ, Ιορδανία, Συρία Κεντρική Ασία Αζερμπαϊτζάν
Δερματική	<i>L. major</i>	<i>Ph. papatasi</i> [†]	Σαουδική Αραβία
	<i>L. tropica</i>	<i>Ph. sergenti</i> [†]	Ιράν, Αφγανιστάν Ινδία

† Αποδεδειγμένος φορέας

* Πιθανός φορέας

Πίνακας 4: Επιδημιολογία της λείσμανίασης των σκύλων και συγκριτική κατανομή των ειδών *Leishmania* και των ειδών *Lutzomyia* στον Νέο Κόσμο. ^{40, 105-109}

Μορφή της νόσου	Είδος παρασίτου	Φορέας (αποδεδειγμένος ή πιθανός)	Γεωγραφική κατανομή
Σπλαχνική	<i>L. chagasi</i> (= <i>L. infantum</i>)	<i>Lu. longipalpis</i> [†]	Κεντρική και Νότια Αμερική
		<i>Lu. youngi</i> [†]	Κεντρική και Νότια Αμερική
		<i>Lu. evansi</i> [*]	Κολομβία, Κόστα Ρίκα, Βενεζουέλα
		<i>Lu. shannoni</i> [*]	Νοτιοανατολικές Η.Π.Α., Ν. Αμερική
	<i>L. amazonensis</i>	<i>Lu. flaviscutelata</i> [*]	Βραζιλία
Δερματική	<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. wellcomei</i> [†]	Βραζιλία
		<i>Lu. whitmani</i> [†]	Βραζιλία, Περού
	<i>L. peruviana</i>	<i>Lu. verrucarum</i> [†]	Περού
		<i>Lu. peruensis</i> [†]	Περού
	<i>L. mexicana</i>	<i>Lu. ayachuchensis</i> [†]	Εκουαδόρ
	<i>L. panamensis</i>	<i>Lu. trapidoi</i> [†]	Κολομβία, Εκουαδόρ

† Αποδεδειγμένος φορέας

* Πιθανός φορέας

Ελλάδα:

Το μοναδικό είδος παρασίτου, που προσβάλλει τους σκύλους στην Ελλάδα, είναι η *L. infantum*^{28,31}, η οποία προκαλεί σπλαχνική λείσμανίαση. Έχει ανιχνευθεί σε πολλές περιοχές της χώρας (κυρίως στην Κρήτη και στην ευρύτερη περιοχή των Αθηνών αλλά και στα Ιόνια νησιά και τη Βορειοδυτική Ελλάδα). Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ο αποδεδειγμένος φορέας της λείσμανίασης των σκύλων στη χώρα. Ωστόσο, οι πιο πιθανοί φορείς είναι οι *Ph. perfilievi* και *Ph. tobbi*, αλλά και οι *Ph. neglectus*, *Ph. sergenti*, *Ph. simici*, *Ph. papatasi*, *Ph. balcanicus*, *Ph. alexandri* και *Ph. mascittii*.^{110,111} Ο *Ph. neglectus* είναι το μοναδικό είδος, που έχει αποδειχθεί ότι μεταδίδει τη σπλαχνική λείσμανίαση στην Ελλάδα, όμως φαίνεται να δείχνει προτίμηση μόνο στον άνθρωπο και σε τρωκτικά και όχι τόσο στον σκύλο.⁴⁹

Το δεύτερο είδος *Leishmania* που έχει βρεθεί στην Ελλάδα είναι η *L. tropica*.^{29,30} Ωστόσο, το είδος αυτό δεν έχει απομονωθεί από σκύλους της χώρας.

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η ταυτοποίηση των ειδών της *Leishmania* που προκαλούν την νόσο στους σκύλους, στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας. Για το λόγο αυτό συγκεντρώσαμε δείγματα μυελού των οστών από 81 σκύλους της περιοχής, όπου ελέγξαμε, με τη χρήση ανοσολογικών και μοριακών τεχνικών, την παρουσία των παρασίτων.

Πειραματικό Μέρος

Υλικά και Μέθοδοι

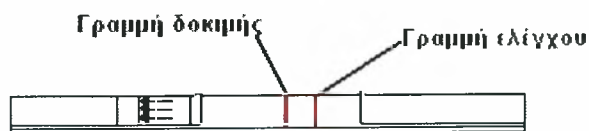
Στα δείγματα μυελού των οστών των 81 σκύλων πραγματοποιήσαμε τις παρακάτω τεχνικές.

A. 1. Ανοσοχρωματογραφική Μέθοδος:

Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία αντισωμάτων κατά της *Leishmania* με τη χρήση του Leishmania Strip quick Test. Πρόκειται για μια ανοσοχρωματογραφική δοκιμή, που επιτυγχάνει την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων σπλαχνικής λεισμανίασης. Αυτή η γρήγορη δοκιμή ανιχνεύει την παρουσία αντισωμάτων έναντι ενός ανασυνδυασμένου αντιγόνου (K39) ειδικού για τη σπλαχνική λεισμανίαση, που προκαλείται από μέλη του συμπλέγματος *L. donovani*. Το πλεονέκτημα αυτής της δοκιμής σε σχέση με άλλες (π.χ. ELISA, IFAT, DAT) είναι ότι δεν παρουσιάζει διασταυρωτική αντίδραση με άλλες παρασιτικές ασθένειες (Ελονοσία, Chagas disease).

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χρήση μιας μεμβράνης (membrane based immunoassay), για την ανίχνευση αντισωμάτων σπλαχνικής λεισμανίασης. Η μεμβράνη έχει επικαλυφθεί εκ των προτέρων με ένα νέο ανασυνδυασμένο αντιγόνο (K39) στην περιοχή της ζώνης δοκιμής και με μία anti-protein A από όρνιθα στη ζώνη ελέγχου. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το δείγμα αντιδρά με μια βαφή με την οποία έχει επικαλυφθεί από πριν το τεστ (protein A-colloidal gold conjugate). Στη συνέχεια το μίγμα προχωρά προς το πάνω μέρος της μεμβράνης και όταν φτάσει στην περιοχή της γραμμής δοκιμής αντιδρά με το ανασυνδυασμένο αντιγόνο και παράγει μια γραμμή κόκκινου χρώματος (Εικ. 8). Η παρουσία αυτής της κόκκινης γραμμής στην περιοχή δοκιμής υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα και η απουσία της αρνητικό.

Καθώς το μίγμα προχωρά μέσω της μεμβράνης στην περιοχή της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης A, εμφανίζεται πάντα μια κόκκινη γραμμή στην περιοχή ελέγχου, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία αντισωμάτων σπλαχνικής λεισμανίασης. Η παρουσία αυτής της κόκκινης γραμμής χρησιμεύει ως επαλήθευση της επάρκειας του όγκου δείγματος και της κατάλληλης ροής, αλλά και ως έλεγχος για την καταλληλότητα των αντιδραστηρίων.¹⁵⁰



Εικόνα 8:¹⁵⁰ Φωτογραφία του *Leishmania Strip Test*

Βήματα διαδικασίας:

- Απόκτηση θερμοκρασίας δωματίου για τα δείγματα και τα strip tests.
- Προσθήκη 20 μl δείγματος στο τεστ, στην περιοχή κάτω από τα βέλη.

- Τοποθέτηση του τεστ σε σωλήνα με τέτοιο τρόπο ώστε το τέλος του να βλέπει προς τα κάτω, όπως υποδεικνύεται από τα βέλη.
- Προσθήκη 150 μl (ή 2-3 σταγόνες) διαλύματος buffer, το οποίο περιέχεται στο kit.
- Ανάγνωση αποτελεσμάτων σε 10 min.

Η μέθοδος αυτή είναι ποιοτική. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορεί να προσδιορίσει την ποσότητα των αντισωμάτων αλλά μόνο την παρουσία τους ή όχι στο δείγμα.

B. 1. Εξαγωγή DNA:

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα των σκύλων έγινε με τη χρήση του συστήματος Magtration System 6GC/12GC και του Magtration MagaZorb DNA Common Kit-200N. Η μέθοδος, που χρησιμοποιείται από το συγκεκριμένο σύστημα, πραγματοποιεί τον μαγνητικό χειρισμό του DNA, με πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο. Η τεχνολογία Magtration χρησιμοποιεί ειδικά μαγνητικά σωματίδια, τα οποία είναι τοποθετημένα σε ένα ειδικά σχεδιασμένο απορριπτόμενο ακροφύσιο (tip). Το DNA προσροφάται στα σωματίδια αυτά και τελικά, μετά από μια διαδικασία πλύσεων και μοριακού μαγνητικού διαχωρισμού, πραγματοποιείται η εξαγωγή του. Το εξαγόμενο DNA έχει πολύ καλή ποιότητα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή μοριακών μεθόδων όπως η PCR.¹⁵¹

B. 2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):

Το DNA, που εξήχθη από τα δείγματα των 81 σκύλων, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια διαδικασία, η οποία επιτρέπει την παραγωγή περισσότερων των 10 εκατομμυρίων αντιγράφων μίας αλληλουχίας DNA στόχου από έναν μικρό μόνο αριθμό μορίων. Η μέθοδος αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους συντελείται σε διακριτά βήματα. Κάθε βήμα χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία προκειμένου να γίνει η θερμική αποδιάταξη και η αντιγραφή του DNA. Συνήθως, η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται με τη χρήση ενός ενζύμου, που ονομάζεται Taq DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε από ένα θερμοφίλο βακτήριο, που ονομάζεται *Thermus aquaticus* και ζει σε πολύ θερμά περιβάλλοντα (50-80°C).¹¹² Η Taq πολυμεράση είναι πολύ σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες και παραμένει ενεργή ακόμη και μετά την αποδιάταξη του DNA, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη προσθήκης νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο.¹¹³ Η δράση του ενζύμου είναι να καταλύει τη δημιουργία μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA του προς ενίσχυση τμήματος (μήτρα DNA) με τη χρήση των δομικών μονάδων του DNA (δηλαδή, των νουκλεοτιδίων) καθώς και ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές), που απαιτούνται για την έναρξη της αντιγραφής.

Τα συστατικά που περιέχονται στο μίγμα της αντίδρασης είναι:

Μήτρα DNA: Είναι η προς ενίσχυση αλληλουχία DNA. Η ποσότητα της μήτρας γενωμικού DNA, που απαιτείται για την αντίδραση, βρίσκεται συνήθως μεταξύ 0,1-1

μg σε τελικό όγκο 50 μl. Μεγαλύτερες ποσότητες DNA συνήθως οδηγούν στην παραγωγή μη ειδικών PCR προϊόντων.¹¹⁴

Εναρκτήρια μόρια (εκκινητές): Είναι τα μόρια, που χρησιμοποιεί η DNA πολυμεράση, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έναρξη της αντιγραφής. Τα μόρια αυτά είναι συμπληρωματικά με τα 3'-άκρα καθεμιάς από τις αλυσίδες της μήτρας DNA. Το μήκος των εναρκτήριων μορίων είναι συνήθως 15-30 νουκλεοτίδια και όσο μεγαλύτερο είναι αυτό, τόσο μεγαλύτερη είναι και η εξειδίκευση της αντίδρασης. Το περιεχόμενο σε GC θα πρέπει να είναι 40-60% και τα νουκλεοτίδια αυτά θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλο το μήκος της αλληλουχίας του εκκινητή. Θα πρέπει, επίσης, να αποφεύγεται η ύπαρξη περισσότερων των τριών G ή C βάσεων στο 3'-άκρο του εκκινητή, προκειμένου να αποτρέπεται η μη ειδική έναρξη της αντιγραφής. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό, που πρέπει να αποφεύγεται κατά την επιλογή των εκκινητών, είναι η συμπληρωματικότητα μεταξύ τους, προκειμένου να αποτρέπεται η δημιουργία διμερών-εκκινητών.

Το σημείο τήξης (T_m) των εκκινητών θα πρέπει, επίσης, να λαμβάνεται υπόψη. Ο υπολογισμός του T_m γίνεται με βάση τον τύπο:

$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$, όπου τα G, C, A και T αποτελούν τον αριθμό των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία του εκκινητή. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού (T_a) είναι περίπου 5°C χαμηλότερη από το T_m .

Το T_m μεταξύ των δύο εκκινητών δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 5°C, επομένως το περιεχόμενο GC αλλά και το μήκος των εκκινητών θα πρέπει να επιλέγονται αναλόγως.¹¹⁴

MgCl₂: Τα δισθενή ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), που προέρχονται από το $MgCl_2$, είναι απαραίτητα για τη δράση της Taq πολυμεράσης καθώς το ένζυμο αυτό είναι εξαρτώμενο από το μαγνήσιο και το χρειάζεται ως συμπάράγοντα προκειμένου να δράσει.¹¹⁵ Ωστόσο, σε υπερβολικές συγκεντρώσεις τα ιόντα Mg^{2+} μειώνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, δεν είναι δυνατή η ενεργοποίηση της δραστηριότητας. Επίσης, τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν σύμπλοκα με κάποια από τα συστατικά της αντίδρασης όπως τα dNTPs, οι εκκινητές αλλά και η μήτρα DNA. Συγκεκριμένα, τα ιόντα Mg^{2+} εξουδετερώνουν τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ εκκινητών-DNA στόχου, με αποτέλεσμα να διευκολύνουν την υβριδοποίηση. Επιπλέον, τα Mg^{2+} δημιουργούν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, γεγονός που φαίνεται να είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση των dNTPs στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.¹¹⁶ Για τους λόγους αυτούς, η κατάλληλη συγκέντρωση του $MgCl_2$ θα πρέπει να επιλέγεται για κάθε συγκεκριμένο πείραμα. Υψηλότερη συγκέντρωση των κατιόντων Mg^{2+} μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, καθώς οι εκκινητές υβριδοποιούνται σε τμήματα DNA με τα οποία δεν έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα. Χαμηλότερη συγκέντρωση Mg^{2+} οδηγεί στην αύξηση των απωστικών δυνάμεων μεταξύ εκκινητών-DNA στόχου, δηλαδή, εμποδίζεται η σωστή υβριδοποίηση, με αποτέλεσμα την παραγωγή λιγότερου προϊόντος. Συνήθως, συνίσταται η συγκέντρωση του $MgCl_2$ να είναι 1-4 mM.¹¹⁴

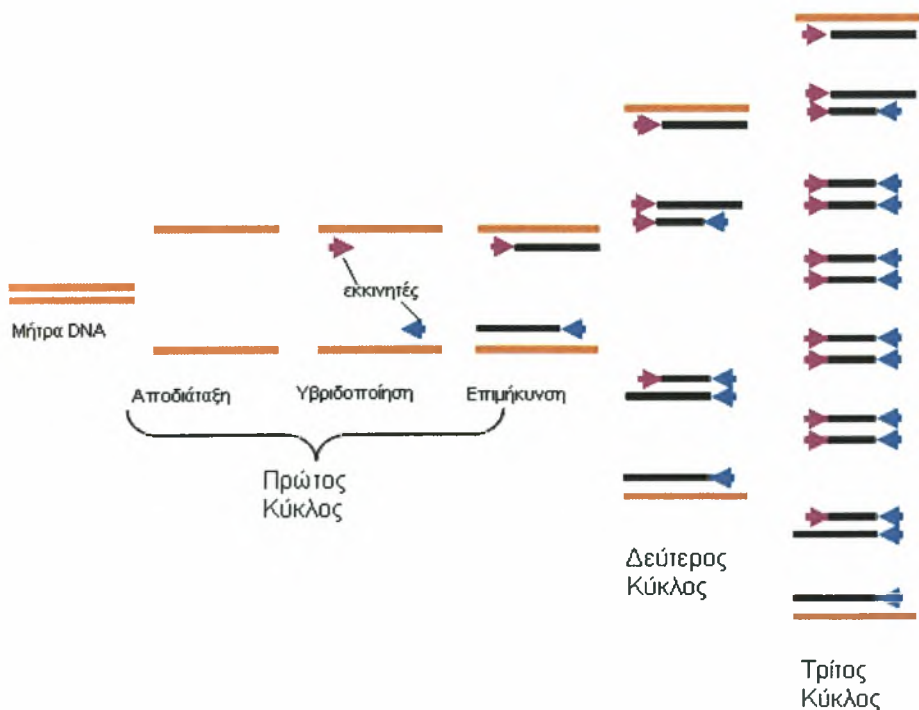
PCR Buffer: Είναι το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, το οποίο παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα της Taq πολυμεράσης. Συνήθως, περιέχει KCl, (πηγή μονοσθενών κατιόντων K^+), προκειμένου να διευκολυνθεί η υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA στόχο. Άλλα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να είναι τα Tween 20, Triton X-100 ή Nonidet P-40 και πιθανόν κάποια επιπλέον πρωτεΐνη (π.χ. αλβουμίνη). Τα συστατικά αυτά βοηθούν

στην αποφυγή της κατακρήμνισης της υδρόφοβης Taq πολυμεράσης μέσα στο υδατικό διάλυμα της αντίδρασης.¹¹⁷

dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια): Είναι οι δομικές μονάδες με τις οποίες συντίθεται το DNA. Η συγκέντρωση καθενός από τα dNTPs στο μίγμα της αντίδρασης είναι συνήθως 200μM. Είναι πολύ σημαντικό να είναι ίσες οι συγκεντρώσεις για κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), καθώς η ανακρίβεια στην αναλογία έστω και ενός dNTP σε σχέση με τα άλλα, μπορεί να αυξήσει δραματικά το επίπεδο της λανθασμένης ενσωμάτωσής τους στο νεοσυντιθέμενο DNA.¹¹⁸ Επίσης, η συγκέντρωση των dNTPs είναι ανάλογη με τη συχνότητα εισαγωγής λάθος νουκλεοτιδίου από την πολυμεράση. Πιο συγκεκριμένα, υπερβολική συγκέντρωση dNTPs μπορεί να αυξήσει τη συχνότητα λάθους της πολυμεράσης ή ακόμη και να αναστείλει την αντίδραση.¹¹⁵

Taq DNA πολυμεράση: Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η Taq DNA πολυμεράση είναι το θερμικά σταθερό ένζυμο, που καταλύει την αντίδραση PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού για την Taq πολυμεράση είναι στους 75-80°C. Συνήθως, χρησιμοποιούνται 1-1,5u του ενζύμου αυτού σε 50 μl όγκου αντίδρασης. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Ωστόσο, αν υπάρχουν ανασταλτικοί παράγοντες στο μίγμα της αντίδρασης, πιθανόν να είναι απαραίτητα μεγαλύτερα ποσά ενζύμου (2-3u) προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης.¹¹⁴

Η αντίδραση της PCR αποτελείται συνήθως από μία σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων. Κάθε κύκλος τυπικά αποτελείται από 2-3 διακριτά βήματα, τα οποία πραγματοποιούνται σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία (Εικ. 9). Η θερμοκρασία και ο χρόνος κάθε βήματος εξαρτάται από ποικίλες παραμέτρους, όπως το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, η συγκέντρωση των δισθενών κατιόντων και των dNTPs και το Tm των εκκινητών.



Εικόνα 9: Τα βήματα της PCR.¹¹⁹

Πιο αναλυτικά, κατά την αντίδραση PCR πραγματοποιείται:

Αρχική αποδιάταξη: Η αρχική αποδιάταξη του DNA είναι το πρώτο βήμα της αντίδρασης. Η ολοκληρωμένη αποδιάταξη της μήτρας DNA στην αρχή της αντίδρασης είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς μια μη ολοκληρωμένη αποδιάταξη μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή χρησιμοποίηση της μήτρας DNA και επομένως σε χαμηλή απόδοση προϊόντος. Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιείται σε διάστημα 1-9 min στους 94-96°C.¹²⁰

Αποδιάταξη: Το βήμα της αποδιάταξης για κάθε κύκλο πραγματοποιείται στους 94-98 °C για 20-30 sec. Στο βήμα αυτό λαμβάνει χώρα η θερμική αποδιάταξη των μορίων DNA μέσω της διάσπασης των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων των δύο αλυσίδων.

Υβριδοποίηση: Στο βήμα της υβριδοποίησης πραγματοποιείται η σύνδεση των εναρκτηρίων μορίων στη μονόκλωνη μήτρα DNA. Συνήθως, η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) είναι 5°C χαμηλότερη από το T_m των εκκινητών και κυμαίνεται μεταξύ 50-65°C. Το βήμα της υβριδοποίησης διαρκεί συνήθως 20-40 sec. Σταθεροί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μήτρας DNA σχηματίζονται μόνο όταν η αλληλουχία του εκκινητή έχει μεγάλη συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία της μήτρας. Η Taq πολυμεράση προσδένεται στο σύμπλοκο εκκινητή-μήτρας ώστε να ακολουθήσει η σύνθεση του DNA στο επόμενο βήμα.¹²¹

Επιμήκυνση (πολυμερισμός): Στο βήμα της επιμήκυνσης πραγματοποιείται η σύνθεση DNA από την Taq DNA πολυμεράση (πολυμερισμός), η οποία παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα στους 75-80°C.^{112,113} Συνήθως το βήμα του πολυμερισμού πραγματοποιείται στους 72°C. Ο χρόνος που απαιτείται είναι 1min για τη σύνθεση τμημάτων DNA μήκους μέχρι και 2 kb. Για την ενίσχυση αλληλουχιών μεγαλύτερου μήκους, ο χρόνος αυτός αυξάνεται περίπου κατά 1 min για κάθε 1000 bp.¹¹⁴ Στο βήμα αυτό, Taq πολυμεράση συνθέτει τη νέα αλυσίδα DNA προσθέτοντας dNTPs, που είναι συμπληρωματικά με τη μήτρα, με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Αριθμός κύκλων: Ο αριθμός των κύκλων της PCR εξαρτάται από την ποσότητα της μήτρας DNA στο μίγμα της αντίδρασης αλλά και από την απόδοση του προϊόντος που προσδοκάται. Σε περιπτώσεις που τα αντίγραφα της μήτρας DNA είναι λιγότερα από 10, θα πρέπει να πραγματοποιούνται 40 κύκλοι αντίδρασης. Αντίθετα, όταν η αρχική ποσότητα της μήτρας είναι υψηλότερη, η πραγματοποίηση 25-30 κύκλων είναι συνήθως επαρκής.¹¹⁴ Η επιλογή του αριθμού των κύκλων είναι πολύ σημαντική για τη σωστή διεξαγωγή της αντίδρασης, καθώς παραπάνω κύκλοι μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των μη ειδικών προϊόντων, ενώ λιγότεροι κύκλοι παράγουν μικρότερη ποσότητα ειδικού προϊόντος.

Τελική επέκταση: Στο βήμα της τελικής επέκτασης λαμβάνει χώρα η συμπλήρωση των προεξεχόντων άκρων των νεοσυντιθέμενων προϊόντων της αντίδρασης. Επίσης, κατά τη διάρκεια του βήματος αυτού, προστίθενται επιπλέον νουκλεοτίδια αδενίνης (A) στο 3'-άκρο των PCR προϊόντων. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της δράσης τερματικής τρανσφεράσης που διαθέτει η Taq πολυμεράση.¹¹⁴

Τα βήματα της αντίδρασης PCR της μελέτης μας ήταν τα εξής:

1. 95°C για 5 min
2. 95°C για 30 sec
3. 65°C για 30 sec

4. 72°C για 30 sec
5. πίσω στο βήμα 2 για 39 φορές
6. 72°C για 5 min

Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 50μl για κάθε δείγμα. Επειδή, η αντίδραση εκτελέστηκε ταυτόχρονα για όλα τα δείγματα, προετοιμάστηκε αρχικά ένα master mix το οποίο περιείχε νερό, PCR Buffer, MgCl₂, dNTPs, εκκινητές και Taq πολυμεράση. Το μίγμα αυτό διαμοιράστηκε σε PCR tubes (ένα για κάθε δείγμα). Σε κάθε PCR tube προστέθηκαν 45μl master mix και 5μl δείγματος DNA. Όλα τα διαλύματα αναδεύτηκαν ελαφρώς και φυγοκεντρήθηκαν πριν εισαχθούν στα σωληνάκια PCR. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται αναλυτικά η σύσταση του μίγματος της κάθε αντίδρασης.

Πίνακας 5: Αντίδραστήρια PCR

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
DNA	-	-	5,0
PCR Buffer	10x	1x	5,0
MgCl ₂	50mM	1,5mM	1,5
dNTPs	10mM	0,8mM	4,0
LEI70R	50mM	0,5mM	0,5
LEI70L	50mM	0,5mM	0,5
Taq polymerase	5u/μl	1u	0,2
H ₂ O	-	-	33,3
Τελικός όγκος	-	-	50,0

Η PCR έγινε με τη χρήση εκκινητών ειδικών για τη *Leishmania*. Η αλληλουχίες των εκκινητών είναι: LEI70R: 5’-CGCGGTGCTGGACACAGGGTA-3’
LEI70L: 5’-CGCAACCTCGGTTCGGTGTG-3’

Οι εκκινητές αυτοί οδηγούν στην ενίσχυση του rDNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος της *Leishmania*. Το προϊόν της αντίδρασης PCR είναι ένα τμήμα DNA μεγέθους περίπου 345 bp.

Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να διαπιστωθεί ποια από τα δείγματα ήταν θετικά στην αντίδραση, δηλαδή, ποιοι σκύλοι είχαν προσβληθεί από το παράσιτο.

B. 3. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης:

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των μορίων DNA (ή RNA) με βάση το μέγεθός τους. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα, που έχουν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA, να μετακινούνται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου, μέσω ενός πηκτώματος αγαρόζης.¹²²

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες¹²³:

α) **Το μέγεθος του DNA.** Πιο συγκεκριμένα, τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια DNA μετακινούνται γρηγορότερα και περισσότερο σε σχέση με τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια.

β) **Τη στερεοδιάταξη του DNA.** Ένα γραμμικό μόριο, ένα ανοικτό κυκλικό μόριο και ένα κλειστό (υπερελικωμένο) κυκλικό μόριο DNA ίδιου μοριακού βάρους παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης.

γ) **Τη συγκέντρωση της αγαρόζης.** Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Στα πηκτώματα μεγάλης συγκέντρωσης (π.χ. 2% αγαρόζη) γίνεται καλύτερος διαχωρισμός των μικρότερων μορίων DNA, ενώ ο διαχωρισμός των μεγαλύτερων μορίων επιτυγχάνεται καλύτερα σε πηκτώματα μικρότερης συγκέντρωσης (π.χ. 0,7% αγαρόζη). Αυτό συμβαίνει γιατί η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια του DNA μειώνεται καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη. Άρα ο διαχωρισμός των μορίων DNA μεγάλου μεγέθους, τα οποία έχουν εκ των πραγμάτων μικρότερη κινητικότητα, γίνεται ακόμη δυσκολότερος σε πηκτώματα μεγάλης συγκέντρωσης αγαρόζης.

δ) **Την τάση.** Γενικά, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η τάση του ρεύματος. Ωστόσο, η ηλεκτροφόρηση σε πολύ υψηλή τάση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαχωριστικής ικανότητας, όπως επίσης και στην τήξη του πηκτώματος.

Η οπτικοποίηση του DNA στο πήκτωμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του **βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)**. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική, που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), φθορίζει με πορτοκαλί χρώμα. Η προσθήκη του EtBr γίνεται κατά την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης.

Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με τη χρήση σκόνης αγαρόζης και ενός ρυθμιστικού διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το TBE (Tris Borate EDTA), το οποίο περιέχει Tris-βορικό και EDTA.

Το DNA, που ηλεκτροφορείται στο πήκτωμα, αναμιγνύεται με ένα διάλυμα χρωστικής (loading buffer), το οποίο περιέχει ένα είδος χρωστικής και έναν παράγοντα, που αυξάνει την πυκνότητα του διαλύματος. Η χρωστική, συνήθως, είναι μπλε της βρωμοφαινόλης ή κυανού της ξυλόλης και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα, οι χρωστικές αυτές είναι ορατές από το ανθρώπινο μάτι, χωρίς τη χρήση ακτινοβολίας UV (όπως συμβαίνει με το EtBr), ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα να μετακινούνται στο πήκτωμα αγαρόζης με ταχύτητα παρόμοια με αυτή ενός τμήματος DNA συγκεκριμένου μεγέθους. Για παράδειγμα, το μπλε της βρωμοφαινόλης μετακινείται με την ταχύτητα μιας αλληλουχίας DNA 300bp και το κυανού της ξυλόλης με την ταχύτητα μιας αλληλουχίας 5000bp. Η ιδιότητα αυτή της χρωστικής δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της ταχύτητας με την οποία μετακινείται το DNA στο πήκτωμα, έτσι ώστε να σταματήσει η ηλεκτροφόρηση την κατάλληλη χρονική στιγμή. Το δεύτερο συστατικό είναι συνήθως η γλυκερόλη, η οποία προκαλεί την αύξηση της πυκνότητας του διαλύματος και με αυτό τον τρόπο υποβοηθά τη βύθιση του DNA στο πηγαδάκι του πηκτώματος.¹²³

Σε μία από τις θέσεις του πηκτώματος προστίθεται ένα διάλυμα (**DNA ladder**), το οποίο αποτελείται από μόρια DNA διαφόρων μεγεθών. Κάθε μόριο DNA του ladder μετακινείται με συγκεκριμένη ταχύτητα στο πήκτωμα και η θέση του αποτελεί αναφορά για όλα τα μόρια DNA του ίδιου μεγέθους. Δηλαδή, το διάλυμα αυτό

χρησιμοποιείται προκειμένου να γίνεται η εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών DNA που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση.

Παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης και ηλεκτροφόρηση:

Το πήκτωμα αгарόζης που χρησιμοποιήσαμε είχε περιεκτικότητα σε αгарόζη 1% και παρασκευάστηκε ως εξής:

1. Προσθήκη 1,6gr αгарόζης και 160ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE σε κωνική φιάλη και ανάδευση.
2. Θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη.
3. Επώση στον πάγκο, προκειμένου να μειωθεί η θερμοκρασία του διαλύματος περίπου στους 55-60°C.
4. Προσθήκη 3μl βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα και ανάδευση.
5. Στη συνέχεια ρίξαμε το διάλυμα της αгарόζης στη βάση, όπου θα στερεοποιούνταν το πήκτωμα. Προηγουμένως, είχαμε τοποθετήσει κάθετα στην κατάλληλη θέση τη "χτένα", ώστε να δημιουργηθούν οι θήκες για τη φόρτωση των δειγμάτων μετά την πήξη της αгарόζης. Επώση μέχρι τη στερεοποίηση.
6. Προσεκτική αφαίρεση της χτένας. Βύθιση του πηκτώματος στο δοχείο ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE.
7. Προσθήκη 3μl χρωστικής (loading buffer) στα 50 μl PCR προϊόντος.
8. Φόρτωση των δειγμάτων και του DNA ladder στις θήκες του πηκτώματος.
9. Ηλεκτροφόρηση σε ~100V για περίπου 40 min.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε η οπτικοποίηση των ζωνών του DNA με τη χρήση ακτινοβολίας UV. Με τον τρόπο αυτό έγινε η εκτίμηση του αποτελέσματος της αντίδρασης PCR για καθένα από τα δείγματα. Στη συνέχεια, έγινε η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα για τα δείγματα, τα οποία ήταν θετικά στην αντίδραση PCR, προκειμένου να ακολουθήσει κλωνοποίηση της αλληλουχίας που ενισχύθηκε.

B. 4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης:

Η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αгарόζης έγινε με τη χρήση του "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System". Το σύστημα αυτό έχει σχεδιαστεί για την εξαγωγή και τον καθαρισμό τμημάτων DNA μεγέθους 100bp-10kb από πηκτώματα αгарόζης. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται βασίζεται σε μεμβράνη και επιτρέπει την ανάκτηση και δέσμευση μέχρι 40μg απομονωμένου DNA. Συγκεκριμένα, η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα, που έχει το DNA, να προσδένεται σε μεμβράνες πυριτίου.

Οι ζώνες του πηκτώματος που περιέχουν το DNA, που μας ενδιαφέρει, αποκόπτονται και διαλύονται παρουσία ισοθειοκυανιδικής γουανιδίνης, η οποία βρίσκεται στο Membrane Binding Solution. Η απομόνωση του DNA από τη διαλυτοποιημένη ζώνη του πηκτώματος επιτυγχάνεται με τη μεταφορά του διαλύματος σε μια ειδική στήλη (SV Minicolumn) και τη φυγοκέντρωσή του. Η φυγοκέντρωση εξαναγκάζει τη διαλυτοποιημένη ζώνη να περάσει διαμέσου της μεμβράνης πυριτίου, που βρίσκεται στη στήλη, και ταυτόχρονα το DNA δεσμεύεται στο πυρίτιο. Ο καθαρισμός του DNA, που έχει προσδεθεί στη μεμβράνη, πραγματοποιείται με τη χρήση του Membrane Wash Solution, το οποίο περιέχει 80% αιθανόλη. Τέλος, η έκλυση του καθαρού πλέον DNA από τη μεμβράνη επιτυγχάνεται με τη χρήση νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες.¹²⁴

Το πρωτόκολλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του DNA από το πηκτώμα αγαρόζης φαίνεται αναλυτικά παρακάτω:

A. Διάλυση του πηκτώματος που περιέχει την επιθυμητή ζώνη.

1. Μετά την ηλεκτροφόρηση, κόψαμε τη ζώνη του πηκτώματος που μας ενδιέφερε και την τοποθετήσαμε σε eppendorf 1,5 ml.
2. Προσθήκη 10 μ l Membrane Binding Solution για κάθε 10 mg πηκτώματος. Ανάδευση σε vortex και επώαση στους 50-65°C μέχρι την πλήρη διάλυση του πηκτώματος. Το Membrane Binding Solution χρησιμοποιείται για τη δέσμευση του DNA στην ειδική στήλη (βλ. παρακάτω)

B. Δέσμευση του DNA

1. Τοποθέτηση της ειδικής στήλης SV Minicolumn σε σωληνάκια συλλογής (collection tubes).
2. Μεταφορά του πηκτώματος που έχει διαλυθεί στην ειδική στήλη. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
3. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 1 min.
Απόρριψη του διαλύματος που βρίσκεται στο σωληνάκι συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάκι. Το DNA μας έχει δεσμευθεί στη στήλη.

Γ. Πλύση

4. Προσθήκη 700 μ l Membrane Wash Solution (που περιέχει αιθανόλη). Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 1 min. Απόχυση του υπερκειμένου και επανατοποθέτηση της ειδικής στήλης στο σωληνάκι συλλογής.
5. Επανάληψη του βήματος 4 με 500 μ l Membrane Wash Solution. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 5 min.
6. Απόχυση του διαλύματος που βρίσκεται στο σωληνάκι και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάκι. Φυγοκέντρηση του περιεχομένου της στήλης για 1 min με ανοιχτό το καπάκι της φυγόκεντρου για την εξάτμιση όσης αιθανόλης έχει παραμείνει στη στήλη.

Δ. Έκλυση

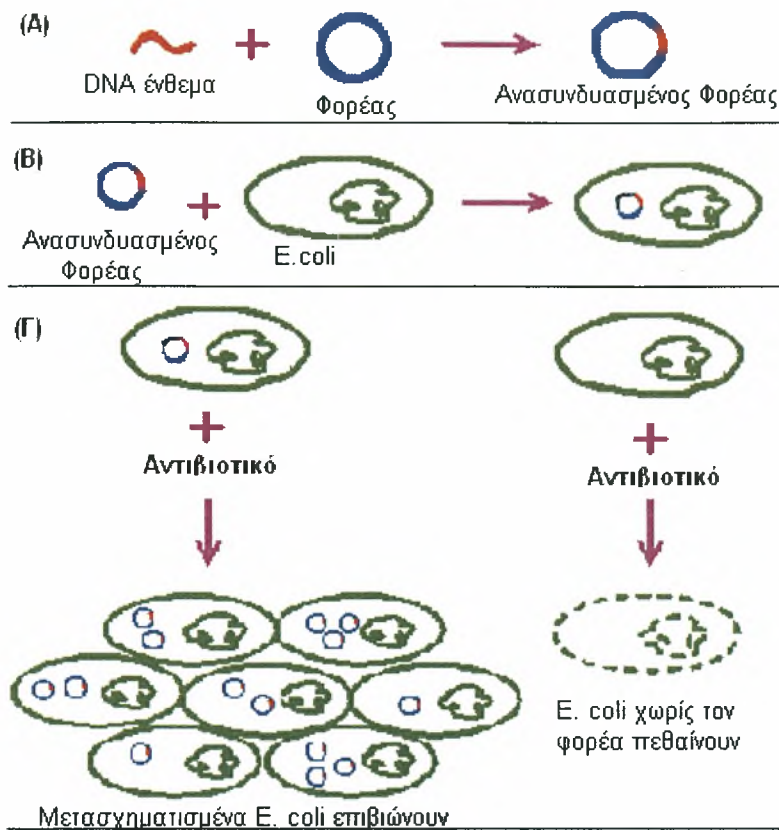
7. Προσεκτική μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf 1,5ml.
8. Προσθήκη 50 μ l Νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες (Nuclease Free Water) στη στήλη. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 1 min. Το DNA μας μεταφέρθηκε στο διάλυμα.
9. Απόρριψη της στήλης και φύλαξη του DNA στους 4°C ή στους -20°C.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας (1 μ l) από το απομονωμένο DNA κάθε δείγματος σε πηκτώμα αγαρόζης (1%), προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση του DNA. Το επόμενο βήμα ήταν η μοριακή κλωνοποίηση της αλληλουχίας DNA με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα.

Γ. Μοριακή Κλωνοποίηση

Η μοριακή κλωνοποίηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται, αρχικά, η απομόνωση μιας καθορισμένης αλληλουχίας DNA και στη συνέχεια η *in vitro* δημιουργία πολλών αντιγράφων της αλληλουχίας αυτής. Για την διεξαγωγή της μεθόδου απαιτείται η χρήση ενός φορέα, στον οποίο ενσωματώνεται η αλληλουχία DNA. Ως φορείς χρησιμοποιούνται συνήθως κυκλικά πλασμίδια. Στην *Εικόνα 10*

φαίνεται μια τυπική διαδικασία κλωνοποίησης με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα και βακτηριακών κυττάρων *E. coli*.



(Δ) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Εικόνα 10¹²⁵: Τα βασικά βήματα της μοριακής κλωνοποίησης με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα. (Α)Ανασυνδυασμός DNA: Το προς κλωνοποίηση DNA (ένθεμα) εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα. Ο φορέας περιέχει ήδη ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. (Β) Μετασχηματισμός: Εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, τα οποία πολλαπλασιάζονται. (Γ) Επιλογή: Καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αντιβιοτικό, προκειμένου να επιβιώσουν μόνο όσα φέρουν το πλασμίδιο. (Δ) Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά, οι μέθοδοι με τις οποίες πραγματοποιήθηκε η μοριακή κλωνοποίηση της αλληλουχίας DNA που ενισχύθηκε με την PCR.

Γ. 1. Ένθεση του rDNA σε πλασμιδιακό φορέα:

Μετά την απομόνωση του τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, πραγματοποιήσαμε ένθεση του τμήματος αυτού μέσα στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(+) (2961 bp) μέσω της αντίδρασης σύνδεσης.

Η αντίδραση σύνδεσης είναι μια διαδικασία, η οποία οδηγεί στην ενσωμάτωση του προς κλωνοποίηση γονιδίου μέσα σε ένα πλασμιδιακό φορέα. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση, η οποία καταλύει την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ των δύο μορίων DNA.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μία αντίδραση σύνδεσης, χρειάζονται τα εξής:

- Το **ένθεμα**: Είναι η αλληλουχία DNA που πρέπει να κλωνοποιηθεί. Με την αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται η εισαγωγή του τμήματος αυτού στον πλασμιδιακό φορέα. Η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = \frac{\text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέματος (σε kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (σε kb)}} \times \text{Μοριακός λόγος} \frac{\text{ενθέματος}}{\text{φορέα}}$$

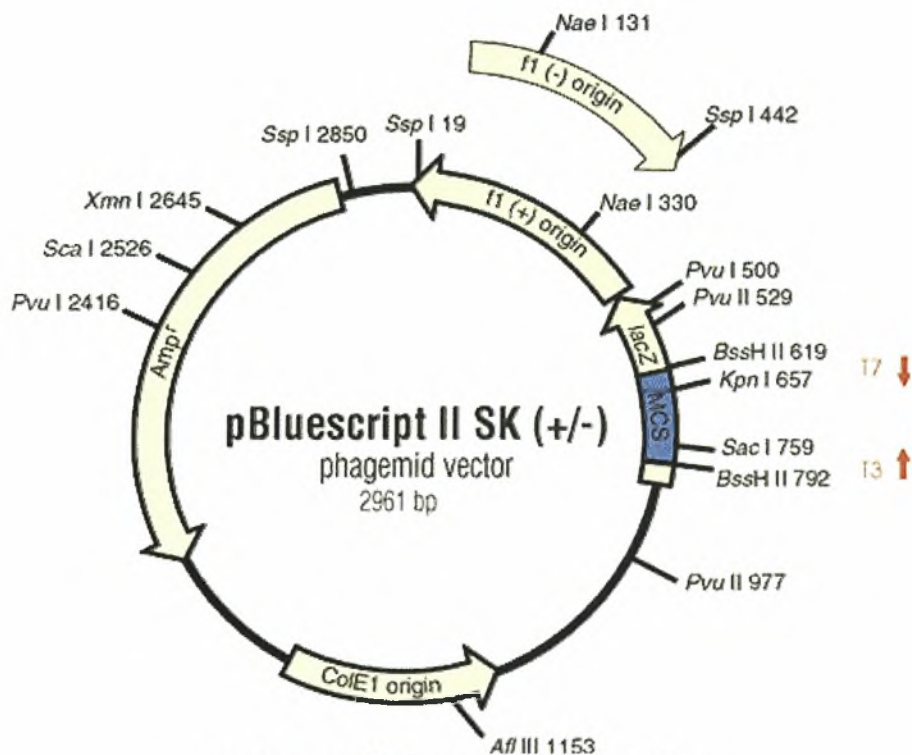
Ο μοριακός λόγος ενθέματος/φορέα είναι συνήθως 3:1.

- **Ο πλασμιδιακός φορέας**: Είναι το κυκλικό μόριο DNA στο οποίο εισάγεται η αλληλουχία DNA που πρέπει να κλωνοποιηθεί. Κάθε φορέας κλωνοποίησης διαθέτει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που του προσδίδουν ιδιότητες, που διευκολύνουν τη διαδικασία της κλωνοποίησης¹²⁶:
 1. Μια περιοχή *ori*, η οποία προσδίδει στο πλασμίδιο την ικανότητα ανεξάρτητης αντιγραφής. Έτσι, το πλασμίδιο μπορεί να αντιγράφεται αυτόνομα μετά την είσοδό του στο βακτηριακό κύτταρο και να πολλαπλασιάζεται σε πολλά αντίγραφα.
 2. Ένα γονίδιο, που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό, όπως για παράδειγμα στην αμπικιλίνη (*Amp^r*). Το γονίδιο αυτό δίνει τη δυνατότητα εργαστηριακής επιλογής των βακτηρίων, που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο.
 3. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*), το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση και προσδίδει τη δυνατότητα της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Το ένζυμο αυτό μεταβολίζει ένα υπόστρωμα (X-gal), που προστίθεται στο θρεπτικό υλικό των βακτηρίων. Ο μεταβολισμός του υποστρώματος αυτού οδηγεί στην παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος με αποτέλεσμα να προσδίδεται μπλε χρώμα στις αποικίες.
 4. Μία περιοχή πολυσυνδέτη (MCS: Multiple Cloning Site region), η οποία περιέχει τις θέσεις αναγνώρισης πολλών περιοριστικών ενζύμων. Η περιοχή αυτή επιτρέπει την ένθεση τμημάτων DNA στο φορέα και τη στόχευσή τους σε συγκεκριμένο σημείο του φορέα.
- Η **T₄ DNA λιγάση**, η οποία προέρχεται από τον βακτηριοφάγο T4. Το ένζυμο αυτό καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 5'-φωσφορικού άκρου ενός δίκλωνου μορίου DNA και του 3'-υδροξυλικού άκρου του ίδιου ή διαφορετικού δίκλωνου μορίου DNA. Η T4 λιγάση μπορεί να συνδέσει μεταξύ τους μόνο δίκλωνα DNA, ενώ δεν έχει καμία δραστηριότητα σε μονόκλωνα μόρια. Τα άκρα των μορίων DNA, που συμμετέχουν στην αντίδραση λιγάσης, μπορεί να είναι τυφλά ή ελεύθερα (προεξέχοντα). Επίσης, η T4 DNA λιγάση είναι ένα ATP-εξαρτώμενο ένζυμο, δηλαδή απαιτεί την παρουσία ATP προκειμένου να δράσει, ενώ χρειάζεται και ιόντα Mg²⁺. Η συγκέντρωση του ATP πρέπει να είναι χαμηλότερη στις αντιδράσεις σύνδεσης, στις οποίες συμμετέχουν μόρια DNA με τυφλά άκρα και συγκεκριμένα δεν πρέπει να ξεπερνά τα 2,5mM. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ATP οδηγούν σε μειωμένη απόδοση.^{127,128}

- Το **buffer** της αντίδρασης, το οποίο είναι το ρυθμιστικό διάλυμα, που παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστητικότητα της T4 DNA λιγάσης. Συνήθως περιέχει Tris-HCl, το οποίο χρησιμεύει για τη ρύθμιση του pH της αντίδρασης, και MgCl₂, το οποίο παρέχει στη λιγάση τα ιόντα Mg²⁺ που είναι απαραίτητα για τη δράση της.¹²² Επίσης, στο buffer περιέχεται ATP προκειμένου να μπορέσει να δράσει η T4 λιγάση αλλά και DTT (διθειοθρεϊτόλη). Η διθειοθρεϊτόλη έχει την ικανότητα να μειώνει ποσοτικά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και να διατηρεί τις μονοθειώλες σε μειωμένα επίπεδα. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις το DTT σταθεροποιεί ένζυμα αλλά και άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν ελεύθερες σουλφυδρικές ομάδες και φαίνεται πως αποκαθιστά τη χαμένη δραστητικότητα που προκαλείται από την οξείδωση των ομάδων αυτών.¹²⁹

Μία πολύ σημαντική παράμετρος για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης σύνδεσης είναι η **θερμοκρασία**, η επιλογή της οποίας πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της T4 DNA λιγάσης είναι περίπου 25°C. Από την άλλη πλευρά, το T_m των προεξεχόντων άκρων των μορίων DNA που πρόκειται να συνδεθούν είναι συνήθως πολύ χαμηλότερο. Αυτό σημαίνει ότι αν η θερμοκρασία της αντίδρασης υπερβαίνει το T_m, δεν είναι δυνατό το ζευγάρωμα των προεξεχόντων άκρων, καθώς η υψηλή θερμοκρασία καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου. Το αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι η μείωση της απόδοσης της αντίδρασης. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητος ο συμβιβασμός μεταξύ του άριστου T_m και της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου, όταν πρόκειται για αντιδράσεις σύνδεσης μεταξύ μορίων DNA με προεξέχοντα συμπληρωματικά άκρα.¹³⁰

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ονομάζεται **pBluescript II SK (+)** και έχει μέγεθος 2961 bp. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φορέα.



Εικόνα 11:¹³¹ Ο φορέας pBluescript II

Ο pBluescript II SK (+) διαθέτει τα χαρακτηριστικά εκείνα που είναι απαραίτητα για έναν φορέα κλωνοποίησης. Συγκεκριμένα, περιέχει:^{132,133}

- α) Την περιοχή **ColE1 origin**, η οποία του δίνει τη δυνατότητα ανεξάρτητης έναρξης της αντιγραφής.
- β) Το γονίδιο **Amp^r**, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.
- γ) Το γονίδιο **lacZ**, το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης.
- δ) Την περιοχή πολυσυνδέτη **MCS**, η οποία περιέχει τις θέσεις αναγνώρισης διαφόρων περιοριστικών ενζύμων. Η περιοχή MCS παρεμβάλλεται στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης με τέτοιο τρόπο ώστε να μη διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο αλλά ούτε και την αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου. Η ενσωμάτωση ενός ξένου τμήματος DNA σε κάποια από τις θέσεις του πολυσυνδέτη οδηγεί σε αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου της β-γαλακτοσιδάσης με αποτέλεσμα την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Έτσι, το κύτταρο δεν μπορεί να μεταβολίσει το X-gal και οι αποικίες που προκύπτουν έχουν λευκό χρώμα.

Η αλληλουχία DNA, που έπρεπε να κλωνοποιηθεί ήταν το προϊόν μιας αντίδρασης PCR. Τα προϊόντα PCR έχουν ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό που προέρχεται από τη δραστικότητα τερματικής τρανσφεράσης που έχει η Taq DNA πολυμεράση.¹³⁴ Συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό προσθέτει μια βάση αδεΐνης στο 3'-άκρο των προϊόντων της αντίδρασης. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να εισαχθούν απευθείας σε έναν πλασμιδιακό φορέα που να περιέχει προεξέχοντα 3'-άκρα θυμίνης (T). Για το λόγο αυτό, ο φορέας μας είναι ήδη κατασκευασμένος ώστε να περιέχει τέτοιου είδους άκρα. Η δημιουργία ενός τέτοιου φορέα γίνεται, αρχικά, με τη χρήση ενός ενζύμου περιορισμού (π.χ. *EcoRI*), που κόβει το πλασμίδιο σε ένα σημείο της περιοχής MCS. Στη συνέχεια, με μια αντίδραση στην οποία χρησιμοποιείται Taq πολυμεράση και δεοξυνουκλεοτίδια θυμίνης (dTTP), δημιουργούνται 3'-άκρα θυμίνης στο φορέα.¹³⁵ Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η αντίδραση σύνδεσης, καθώς ο φορέας έχει πλέον συμπληρωματικά άκρα με τα προϊόντα PCR.

Τα συστατικά της αντίδρασης σύνδεσης, που πραγματοποιήθηκε σε 10 μl τελικού όγκου για την παρούσα μελέτη, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Αντίδραση σύνδεσης.

	Όγκος (μl)
Ένθεμα-DNA	3,0
Φορέας	1,0
Buffer (10x)	1,0
Λιγάση T ₄ (1u/μl)	1,0
H ₂ O	4,0
Τελικός όγκος	10,0

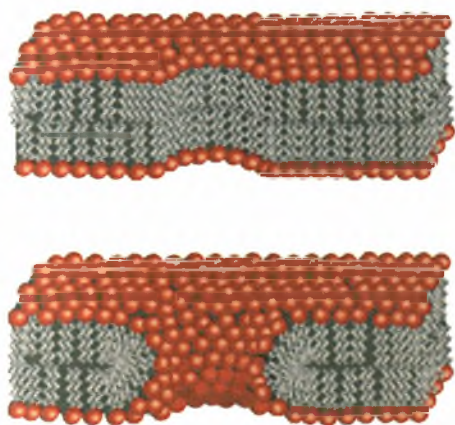
Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων ακολούθησε επώαση overnight στους 4°C για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Γ. 2. Μετασχηματισμός κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης:

Το επόμενο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E. coli*) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης.

Η **ηλεκτροδιάτρηση** είναι μια μηχανική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πολικών μορίων σε ένα κύτταρο-δέκτη, διαμέσου της πλασματικής του μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται με την εξωτερική εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο προκαλεί μια αρκετά σημαντική αύξηση στην ηλεκτρική αγωγιμότητα και διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης. Έτσι, είναι δυνατή η είσοδος φορτισμένων μορίων, όπως το DNA, μέσα στο κύτταρο.¹³⁶

Η αρχή της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης βασίζεται στη σχετικά ασθενή φύση των υδροφοβικών/υδροφιλικών αλληλεπιδράσεων της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας, αλλά και στην ικανότητά της να ανασυγκροτείται αυθόρμητα, μετά τη διαταραχή της.¹³⁷ Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου στα κύτταρα-δέκτες προκαλείται αλλαγή στο δυναμικό της πλασματικής μεμβράνης, η οποία στη συνέχεια φορτίζεται. Το γεγονός αυτό προκαλεί τοπική αναδιάταξη των λιπιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία υδρόφοβων πόρων που σταδιακά μετατρέπονται σε υδρόφιλους¹³⁸ (Εικ. 12).



Εικόνα 12:¹³⁹ Σχηματική απεικόνιση της διευθέτησης των λιπιδίων σε έναν υδρόφοβο πόρο (επάνω) και σε έναν υδρόφιλο πόρο (κάτω).

Μέσα από τους υδρόφιλους αυτούς πόρους μπορούν να περάσουν τα φορτισμένα ιόντα και μόρια, που βρίσκονται στο διάλυμα, που περιβάλλει τα κύτταρα. Καθώς συμβαίνει αυτή η μετακίνηση, η μεμβράνη αποφορτίζεται και οι πόροι αρχίζουν να κλείνουν, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Ωστόσο, η εφαρμογή της ηλεκτροδιάτρησης μπορεί να προκαλέσει ιοντική ανισορροπία, πιθανόν εξαιτίας της μη εξειδικευμένης εισροής και εκροής υλικού μέσα και έξω από τα κύτταρα. Η ανισορροπία αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ασταθή κυτταρική λειτουργία και τελικά στο θάνατο των κυττάρων.¹⁴⁰ Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα επωάζονται σε ειδικό θρεπτικό υλικό αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση. Το υλικό αυτό είναι συνήθως το SOC (2% w/v bacto-tryptone, 0.5% w/v bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂ και 20mM glucose), το οποίο οδηγεί και σε αύξηση της απόδοσης του μετασχηματισμού.¹⁴¹

Το πρωτόκολλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:10 στο προϊόν της αντίδρασης λιγάσης (1 μl προϊόντος + 9 μl H₂O) και έπειτα ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα:

1. Προσθήκη 2 μl από το αραιωμένο προϊόν (1:10) της αντίδρασης λιγάσης σε ~ 40 μl κυττάρων (Ec). Επώαση στον πάγο για 1 min.
2. Μεταφορά των κυττάρων σε παγωμένη κυψελίδα και στη συνέχεια ηλεκτροδιάτρηση, προκειμένου να προσλάβουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.
3. Αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση προσθέσαμε 1000μl διαλύματος SOC, το οποίο βοηθά τα κύτταρα να ανακτήσουν τη φυσιολογική τους κατάσταση (ωσμορύθμιση) και παράλληλα είναι και θρεπτικό υλικό.
4. Ανάδευση των κυττάρων με *pipette mix* και μεταφορά τους σε σωλήνα, όπου παρέμειναν για επώαση στους 37°C για περίπου 40 min. Τα 40 min είναι ο χρόνος που χρειάζεται προκειμένου να επουλωθούν τα κύτταρα από την ηλεκτροδιάτρηση.

Η επώαση των 40 min στους 37°C πραγματοποιήθηκε για την επούλωση των κυττάρων από την ηλεκτροδιάτρηση. Ακολούθησε η επίστρωση της υγρής καλλιέργειας των κυττάρων σε τρυβλία, που περιείχαν θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη τους.

Γ. 3. Επίστρωση τρυβλίων:

Η επίστρωση των κυττάρων έγινε σε τρυβλία Petri τα οποία περιείχαν θρεπτικό μέσο LB άγαρ (10g/l Tryptone, 5g/l Yeast extract, 10g/l NaCl). Ένα επιπλέον συστατικό του θρεπτικού μέσου ήταν το αντιβιοτικό αμικικιλίνη (1μl/ml).

Τα βακτηριακά στελέχη, που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό, δεν διέθεταν στο γονιδιώμά τους κάποιο γονίδιο που να προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη. Αντιθέτως, ένα τέτοιο γονίδιο περιέχεται στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II. Έτσι, με τη χρήση της αμικικιλίνης επετεύχθει ο θάνατος των μη μετασχηματισμένων κυττάρων και η επιβίωση όσων είχαν προσλάβει το πλασμίδιο.

Οι αποικίες που προέκυψαν, προήλθαν από δύο κατηγορίες κυττάρων. Στη μία κατηγορία ανήκουν τα κύτταρα που είχαν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Αντίθετα, τα κύτταρα της άλλης κατηγορίας είχαν προσλάβει το μη ανασυνδυασμένο φορέα. Για το διαχωρισμό των δύο αυτών κατηγοριών χρησιμοποιήθηκε το X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside). Το X-gal αποτελεί υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση, η οποία το διασπά σε γαλακτόζη και 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole. Το τελευταίο οξειδώνεται στη συνέχεια σε ένα αδιάλυτο και μπλε προϊόν (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo).¹⁴² Εκτός από το X-gal, χρησιμοποιήθηκε και ο επαγωγέας IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), ο οποίος προάγει την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Το μόριο του IPTG έχει την ικανότητα να προσδένεται στην πρωτεΐνη-καταστολέα, η οποία καταστέλλει το *lacZ* σε συνθήκες απουσίας λακτόζης. Η πρόσδεση αυτή απενεργοποιεί τον καταστολέα με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του *lacZ*.¹⁴³

Επομένως, οι αποικίες, που προήλθαν από κύτταρα μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένους φορείς, είχαν λευκό χρώμα, καθώς το *lacZ* δεν εκφράστηκε, λόγω

του ενθέματος. Αντίθετα, οι αποικίες των κυττάρων με μη ανασυνδυασμένους φορείς εξέφραζαν κανονικά το *lacZ* και είχαν μπλε χρώμα.

Έτσι, μετά την επούλωση από την ηλεκτροδιάτρηση, μεταφέραμε από τους σωλήνες 200μl κυττάρων σε erpendorfs (των 1,5 ml), όπου προσθέσαμε, επιπλέον, 30 μl υποστρώματος X-gal και 3 μl του επαγωγέα IPTG. Ακολούθησε επίστρωση των τρυβλίων με το περιεχόμενο των erpendorf και επώαση στους 37°C για 12 ώρες για την ανάπτυξη αποικιών.

Οι λευκές αποικίες, που προέκυψαν, μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από τις καλλιέργειες αυτές.

Γ. 4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA:

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της **αλκαλικής λύσης**. Πρόκειται για μια μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα. Αρχικά, τα κύτταρα αυτά εναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα που περιέχει γλυκόζη, Tris και EDTA. Η γλυκόζη παρέχει οσμωτική σταθερότητα στο εναιώρημα. Παράλληλα, εμποδίζει την πλήρη λύση των κυττάρων, που θα οδηγούσε στην απελευθέρωση και του χρωμοσωμικού DNA. Το Tris χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH (=8,0) και το EDTA για τη δέσμευση των δισθενών κατιόντων και επομένως την αναστολή της δράσης των DNAσών. Η αλκαλική λύση συνίσταται στη χρήση διοξειδίου του νατρίου (NaOH) και SDS (sodium dodecyl sulfate), που περιέχονται στο διάλυμα II. Το NaOH προκαλεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών που διατηρούν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό, που προκαλεί τη μερική λύση της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας, δημιουργώντας μικρές "τρύπες" σε αυτή. Οι τρύπες αυτές επιτρέπουν την έξοδο των πλασμιδίων από τα κύτταρα, αλλά συγκρατούν το χρωμοσωμικό DNA εντός των κυττάρων. Επιπλέον, το SDS δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με πρωτεΐνες και RNA. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα III που περιέχει οξικό κάλιο (CH₃COOK) με pH ~4,8. Το CH₃COOK μειώνει το pH του διαλύματος εξουδετερώνοντας το NaOH. Παράλληλα προκαλεί την κατακρήμνιση των συμπλόκων SDS-RNA και SDS-πρωτεϊνών καθώς και των διαφόρων κυτταρικών υπολειμμάτων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με μια σειρά αναδεύσεων, κατακρήμνισεων, φυγοκεντρήσεων και απομάκρυνσης υπερκειμένου με αποτέλεσμα την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, το οποίο υπόκειται σε κατακρίμνιση με αιθανόλη.¹⁴⁴

Η **κατακρήμνιση με αιθανόλη** είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και τη συμπύκνωση του DNA. Η βασική διαδικασία της μεθόδου είναι η κατακρήμνιση του DNA λόγω της προσθήκης αιθανόλης και άλατος στο υδατικό διάλυμα.

Το DNA είναι ένα πολικό μόριο, λόγω των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών (PO₃⁻) ομάδων του. Έτσι, με βάση την αρχή "τα όμοια διαλύουν όμοια" τα μόρια DNA είναι ευδιάλυτα στο νερό, που είναι επίσης πολικό. Η υψηλή πολικότητα του νερού ανακλάται στην υψηλή τιμή διηλεκτρικής σταθεράς που διαθέτει. Αυτό σημαίνει ότι η ηλεκτρικές δυνάμεις μεταξύ δύο οποιωνδήποτε φορτίων, που βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα, είναι πολύ μειωμένες σε σχέση με εκείνες που δημιουργούνται στο κενό ή τον αέρα.

Ο ρόλος του άλατος στην κατακρήμνιση είναι για να εξουδετερώσει τα αρνητικά φορτία των μορίων του DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται το CH_3COONa (ή CH_3COOK). Τα κατιόντα του άλατος (Na^+) εξουδετερώνουν το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων, με αποτέλεσμα το μόριο του DNA να γίνονται λιγότερο υδρόφιλα και αδιάλυτα στο νερό.

Η αιθανόλη είναι ένα λιγότερο πολικό μόριο με πολύ μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από εκείνη του νερού. Για το λόγο αυτό, διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο φορτισμένων μορίων, σε αντίθεση με το νερό, το οποίο την παρεμποδίζει. Επομένως, η προσθήκη αιθανόλης στο διάλυμα επιτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων Na^+ ή (K^+) και PO_3^- , με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερών ιονικών δεσμών. Η εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων του DNA έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πολικότητας του μορίου, η οποία οδηγεί, τελικά, στην κατακρήμνιση.¹²²

Προκειμένου να γίνει η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, πραγματοποιήθηκε, αρχικά, η μεταφορά των λευκών αποικιών σε υγρή καλλιέργεια για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.

Κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε έναν σωλήνα όπου υπήρχε 1 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB broth (10g/l Tryptone, 5g/l Yeast extract, 10g/l NaCl). Ακολούθησε επώαση με ήπια ανάδευση στους 37°C για 12 ώρες, προκειμένου να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα των αποικιών.

Μετά την πάροδο των 12 ωρών ήταν δυνατή η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (*alkaline lysis*) από τις καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Τα βήματα του πρωτοκόλλου της απομόνωσης ήταν τα εξής:

1. Μεταφορά των αποικιών σε eppendorfs (1,5 ml).
2. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 3 min. Αφαίρεση του υπερκειμένου. Στο ίζημα βρισκόταν τα βακτήρια.
3. Προσθήκη 100 ml παγωμένου διαλύματος I, το οποίο περιείχε γλυκόζη. Αναδιάλυση του ιζήματος, ανάδευση με vortex για 1 min και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
4. Προσθήκη 200 μl διαλύματος II, το οποίο περιείχε NaOH και SDS. Ανάδευση γυρίζοντας ανάποδα το eppendorf 5 φορές και επώαση στον πάγο για 3-5 min.
5. Προσθήκη 150 μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου (CH_3COOK) (με pH ~4,8). Ανάδευση στο vortex και επώαση στον πάγο για 8-10 min.
6. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 5 min και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf. Στο υπερκείμενο περιεχόταν το πλασμιδιακό DNA.
7. Προσθήκη αιθανόλης 100%, όγκου 2V. Ανάδευση με Vortex για λίγα δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min. Σε αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε η κατακρήμνιση του DNA. Δεν προστέθηκε άλας γιατί υπήρχε ήδη από το βήμα 5 (CH_3COOK).
8. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 5 min, αφαίρεση υπερκειμένου και διατήρηση του ιζήματος, όπου βρίσκεται το DNA.
9. Προσθήκη αιθανόλης 70%, όγκου 0,5V στο ίζημα, για την απομάκρυνση των αλάτων που πιθανόν είχαν απομείνει. Ανάδευση γυρίζοντας ανάποδα το eppendorf και επανάληψη του βήματος 8.
10. Πλήρης εξάτμιση της αιθανόλης διατηρώντας ανοιχτό το καπάκι του eppendorf για λίγα λεπτά και αναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl TE-RNAase, που περιείχε Tris-HCL, EDTA και RNAase (20μg/ml) και απομάκρυνε το RNA από το διάλυμα. Διατήρηση στους 4°C.

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ακολούθησε η πέψη του με ένα ένζυμο περιορισμού, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την ένθεση του DNA μας στον πλασμιδιακό φορέα.

Γ. 5. Πέψη πλασμιδιακού DNA:

Η πέψη έγινε με τη χρήση ενός ενζύμου περιορισμού που ονομάζεται *PvuII*. Τα περιοριστικά ένζυμα (ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες) έχουν την ιδιότητα να κόβουν δίκλωνα ή μονόκλωνα DNA σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που ονομάζονται θέσεις περιορισμού.¹⁴⁵ Το *PvuII* είναι μια περιοριστική ενδονουκλεάση τύπου II που απομονώθηκε από το βακτήριο *Proteus vulgaris*. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία 5’-CAGCTG-3’ και διασπά το DNA στην περιοχή μεταξύ των δύο κεντρικών βάσεων GC της αλληλουχίας αυτής. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης περιορισμού από το *PvuII* είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων Mg^{2+} . Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η δημιουργία τμημάτων DNA με τυφλά άκρα.¹⁴⁶

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl με την προσθήκη 2μl πλασμιδιακού DNA. Το buffer της αντίδρασης περιείχε 10mM Tris-HCl (pH 7,5 στους 37°C), 10mM $MgCl_2$, 50mM NaCl και 0,1mg/ml BSA. Οι ποσότητες των συστατικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA με *PvuII*.

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
Πλασμιδιακό DNA	-	-	2,0
Buffer	10x	1x	1,0
<i>PvuII</i>	10 u/μl	2 units	0,2
H ₂ O	-	-	6,8
Τελικός όγκος	-	-	10,0

Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Ο φορέας pBluescript II διαθέτει δύο θέσεις περιορισμού για το ένζυμο *PvuII*. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής MCS και συγκεκριμένα στις νουκλεοτιδικές θέσεις 529 και 977 (βλ. *Εικ. 11*). Επομένως, η πέψη ανασυνδυασμένων φορέων με το *PvuII* οδήγησε στη δημιουργία δύο γραμμικών τμημάτων DNA μεγέθους περίπου 800bp και 2500bp αντίστοιχα. Το τμήμα των 800bp αποτελείται από το ένθεμα καθώς και τις αλληλουχίες του φορέα, που βρίσκονται εκατέρωθεν του ενθέματος και μεταξύ των θέσεων περιορισμού του *PvuII*. Το τμήμα των 2500bp είναι ο υπόλοιπος φορέας. Αντιθέτως, η πέψη μη ανασυνδυασμένων φορέων οδήγησε στη δημιουργία δύο τμημάτων μεγέθους περίπου 450bp (περιοχή μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης του ενζύμου) και 2500bp (υπόλοιπος φορέας).

Για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος της αντίδρασης πέψης, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αгарόζης 1% στα 100 kV για περίπου 40 min.

Ακολούθησε καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA των δειγμάτων, στα οποία επιβεβαιώθηκε η κλωνοποίηση, μέσω εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

Γ. 6. Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη:

Η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από ένα δείγμα DNA. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δημιουργία δύο φάσεων και συγκεκριμένα, μιας οργανικής και μιας υδατικής φάσης. Ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιείται μετά από φυγοκέντρηση ενός μίγματος, που περιέχει ένα υδατικό διάλυμα (π.χ. DNA) και ένα οργανικό διάλυμα (π.χ. φαινόλη ή χλωροφόρμιο). Η προσθήκη φαινόλης οδηγεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τέτοιο τρόπο ώστε τα υδρόφοβα αμινοξέα να μεταφέρονται στο εξωτερικό του μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά των πρωτεϊνών στην οργανική φάση της φαινόλης, ενώ το υδρόφιλο DNA παραμένει στην υδατική φάση. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται ακόμη καλύτερα με την προσθήκη χλωροφορμίου, το οποίο αυξάνει την πυκνότητα της οργανικής φάσης και βοηθά τη μεταφορά της στο κάτω μέρος του eppendorf.¹²²

Πρωτόκολλο εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο:

1. Προσθήκη 350μl H₂O στα 50μl του DNA με την TE-RNAase για τελικό όγκο 400μl.
2. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης:χλωροφορμίου (1:1), δηλαδή 200μl φαινόλης και 200μl χλωροφορμίου. Καλή ανάδευση.
3. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 5 min.
4. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.
5. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου (~400μl) και ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 5 min.
7. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.
8. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου (~400μl) και ανάδευση.
9. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 5 min.
10. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο eppendorf.

Μετά την εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο, το DNA καθαρίστηκε και συμπυκνώθηκε με κατακρήμνιση με αιθανόλη. Το άλας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το CH₃COONa. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν όμοιο με αυτό της κατακρήμνισης μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, με μόνη διαφορά την επιπλέον χρήση γλυκογόνου. Το γλυκογόνο αυξάνει την απόδοση της κατακρήμνισης λειτουργώντας ως αδρανής φορέας του DNA. Συγκεκριμένα, επειδή είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη, σχηματίζει ένα ίζημα που "παγιδεύει" τα νουκλεϊκά οξέα. Έτσι, η χρήση του γλυκογόνου διευκολύνει την κατακρήμνιση του DNA κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης.¹⁴⁷

Πρωτόκολλο κατακρήμνισης με αιθανόλη και γλυκογόνο:

1. Προσθήκη 2,5V αιθανόλης 100%, άλατος CH₃COONa (2,31M → 0,3M) και 0,5μl γλυκογόνου. Ανάδευση και επώαση στους -20°C για 15 min.
2. Φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 15 min και απόρριψη υπερκείμενου.
3. Προσθήκη 0,5V αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση σε rpm_{max} για 5 min.
4. Απόρριψη υπερκείμενου και επώαση ιζήματος στους 37°C για την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης. Αναδιάλυση σε 100μl νερού.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια ακόμη αντίδραση πέψης με *PvuII*, χρησιμοποιώντας μέρος του καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Σκοπός της αντίδρασης ήταν αφενός η ποσοτικοποίηση του DNA και αφετέρου η επιβεβαίωση ότι είχε απομακρυνθεί όλη η φαινόλη από τα δείγματα.

Δ. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας:

Το τελικό στάδιο της μελέτης ήταν η **εύρεση της αλληλουχίας** του ενθέματος. Τα δείγματα του πλασμιδιακού DNA στάλθηκαν σε μια εταιρία, η οποία πραγματοποιεί τον προσδιορισμό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τη χρήση της μεθόδου **Sanger** (ή dideoxynucleotide sequencing). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs), εκτός των φυσιολογικών νουκλεοτιδίων (dNTPs). Η διαφορά των ddNTPs, σε σχέση με τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια, που περιέχονται στο DNA, είναι ότι τα πρώτα διαθέτουν ένα υδρογόνο στον 3' άνθρακα αντί για μία υδροξυλομάδα (-OH). Τα νουκλεοτίδια αυτά (ddNTPs) τερματίζουν την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA, καθώς δεν μπορούν να δημιουργήσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο.

Η μέθοδος ξεκινά με την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA με τη χρήση NaOH. Μια αντίδραση Sanger αποτελείται από τα ακόλουθα: α) μια μονόκλωνη αλυσίδα, που πρόκειται να αλληλουχηθεί, β) εκκινητές DNA (μικρά τμήματα DNA, που είναι συμπληρωματικά με το τμήμα που πρέπει να αλληλουχηθεί και ραδιενεργά σημασμένα στο 5'-άκρο τους), γ) ένα μίγμα από ένα συγκεκριμένο είδος ddNTP (π.χ. ddATP) με το αντίστοιχο dNTP (π.χ. dATP) και τα υπόλοιπα τρία dNTPs (dCTP, dGTP και dTTP). Ο πολυμερισμός ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη της DNA πολυμεράσης και σταματά μόλις ένα ddATP ενσωματωθεί στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Έτσι, σχηματίζεται μια σειρά από σημασμένες αλυσίδες, το μήκος των οποίων εξαρτάται από την τοποθεσία του ddATP σε σχέση με το 5'-άκρο.

Η αντίδραση πραγματοποιείται τέσσερις φορές, με τη χρήση διαφορετικού ddNTP κάθε φορά. Τα προϊόντα καθεμιάς από τις τέσσερις αντιδράσεις μεταφέρονται σε ξεχωριστές σειρές ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτροφορούνται, προκειμένου να διαχωριστούν τα τμήματα DNA διαφορετικού μήκους. Ακολουθεί μεταφορά του πηκτώματος σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια αυτοραδιογραφία, προκειμένου να εμφανιστούν μόνο οι ζώνες του πηκτώματος που διαθέτουν ραδιενεργό 5'-άκρο. Τα μικρότερα τμήματα DNA που προέκυψαν από την αντίδραση μεταφέρονται με μεγαλύτερη ταχύτητα και πιο μακριά σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Όταν, λοιπόν, η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων και των τεσσάρων αντιδράσεων γίνεται στο ίδιο πήκτωμα, είναι δυνατός ο καθορισμός της αλληλουχίας του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (με κατεύθυνση 5' προς 3') πραγματοποιείται διαβάζοντας το πρότυπο των ζωνών, που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση, ξεκινώντας από τον πάτο του πηκτώματος και τελειώνοντας στην κορυφή του. Η αλληλουχία, που προσδιορίζεται με αυτό τον τρόπο είναι η συμπληρωματική του τμήματος DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα.^{148,149}

Αποτελέσματα

Ανοσοχρωματογραφική Μέθοδος:

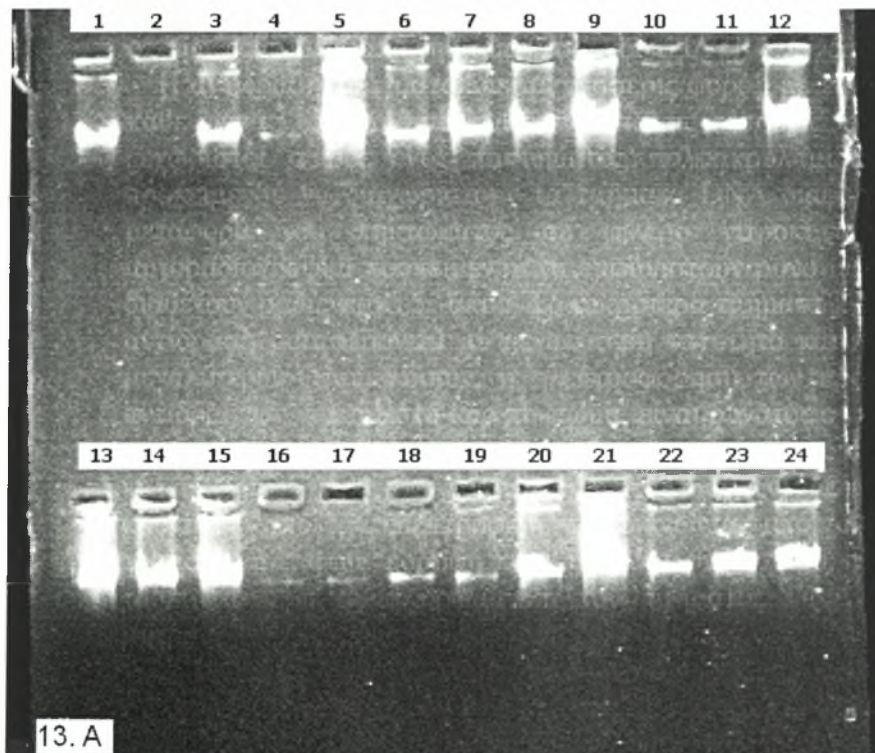
Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύθηκε η ύπαρξη αντισωμάτων στα 81 δείγματα των σκύλων. Τελικά, βρέθηκε ότι οι 37 από τους 81 σκύλους ήταν θετικοί στη δοκιμή αντισωμάτων. Δηλαδή, ένα ποσοστό περίπου 46% των σκύλων, που εξετάστηκαν είχε προσβληθεί από κάποιο στέλεχος του παρασίτου της *Leishmania*.

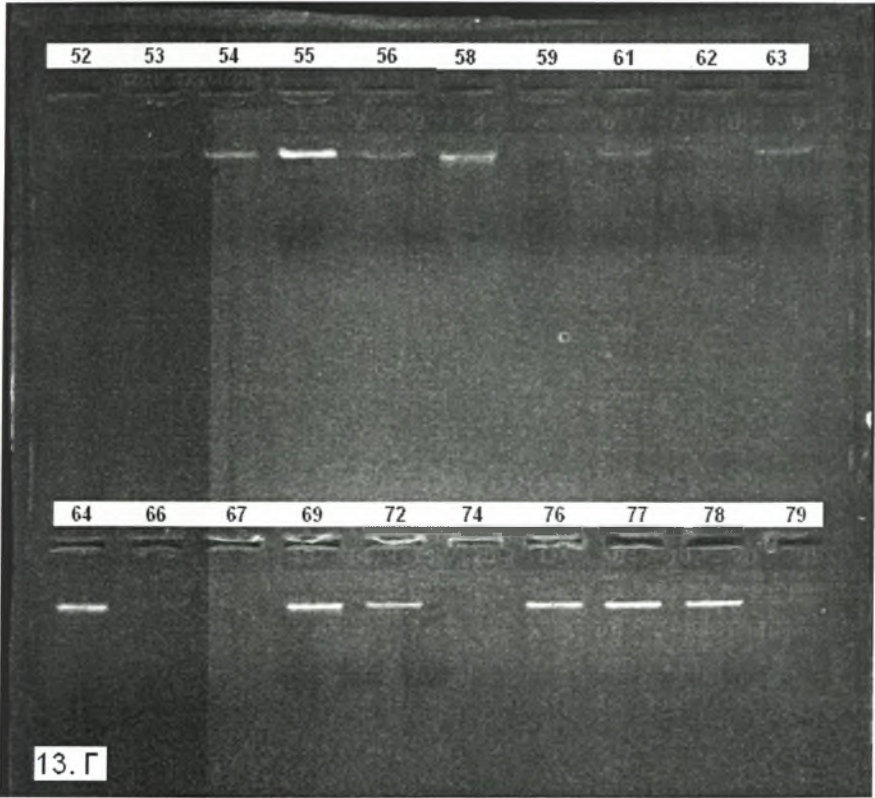
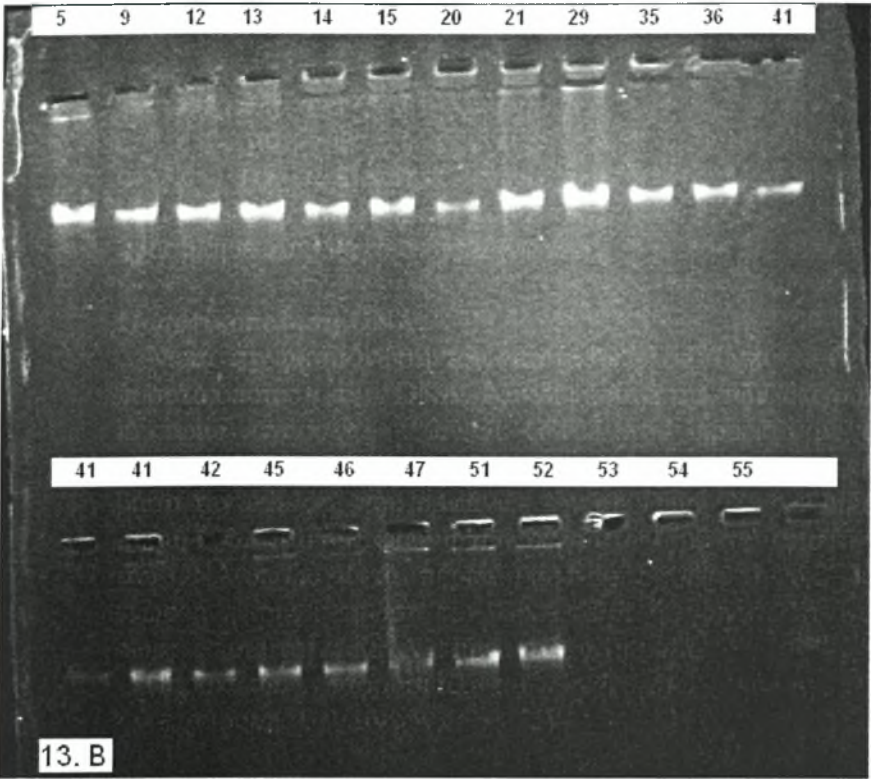
Ποσοτικοποίηση DNA:

Μετά την απομόνωση του γενετικού υλικού από τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του DNA. Μικρή ποσότητα των δειγμάτων ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Οι ζώνες που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση αντιπροσώπευαν το ολικό DNA των δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση του DNA έγινε με βάση την ένταση, που εμφάνιζε η κάθε ζώνη. Συγκεκριμένα, σε μια ζώνη με πολύ μικρή ένταση όπως εκείνη των δειγμάτων 52 και 79 στην εικόνα 13.Γ, η ποσότητα του DNA υπολογίζεται περίπου σε 5ng. Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν να γίνει γνωστή η συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν σωστές ποσότητες DNA στην αντίδραση PCR.

Παρακάτω, παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες από τις εικόνες των ηλεκτροφορήσεων αυτών (Εικ. 13).

Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση του DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα μυελού των οστών των σκύλων.



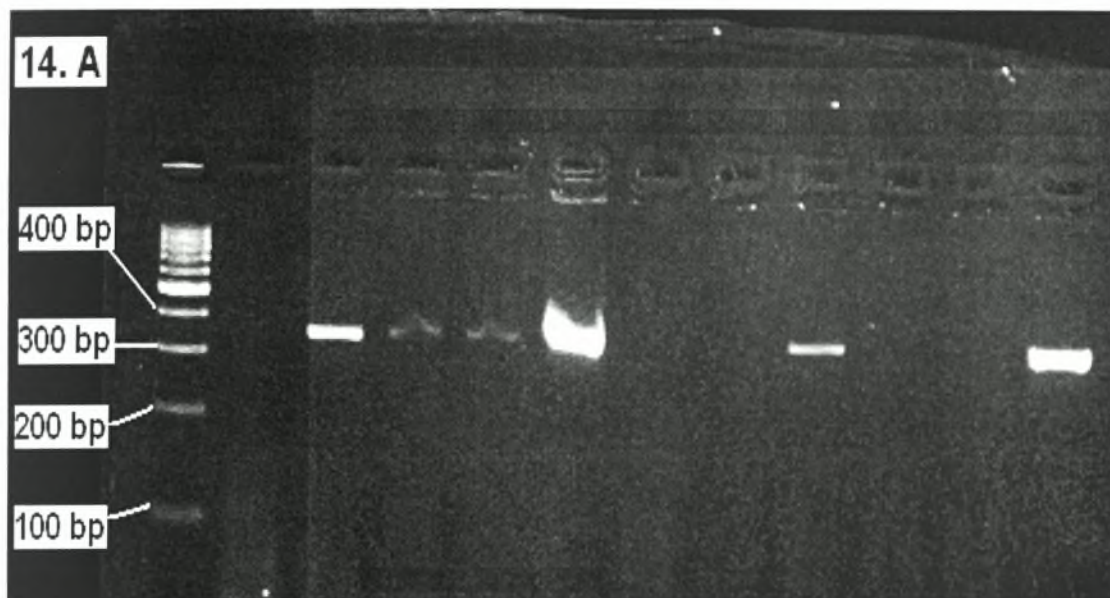


Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):

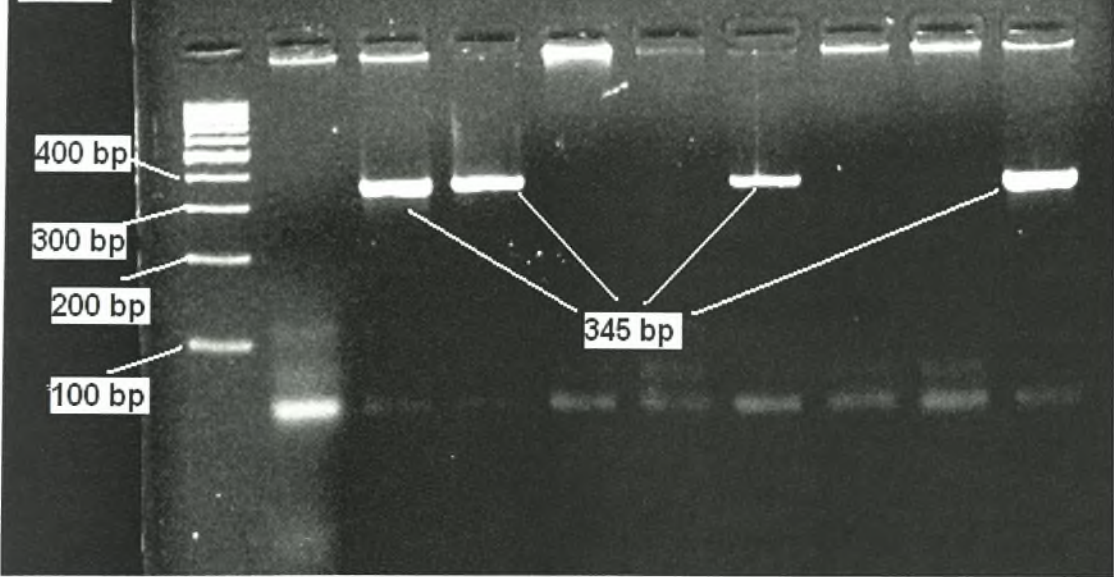
Η PCR, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οδήγησε στην ενίσχυση ενός τμήματος DNA μεγέθους περίπου 345 bp και συγκεκριμένα του rDNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος της *Leishmania*. Επομένως, η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR οδήγησε στη δημιουργία ζωνών περίπου στο ύψος των 345 bp, για τα δείγματα των σκύλων που είχαν προσβληθεί από το παράσιτο. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR έδειξαν ότι οι 16 από τους 81 σκύλους ήταν θετικοί. Δηλαδή, περίπου το 20% των σκύλων που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν προσβεβλημένοι από το παράσιτο.

Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες από τις εικόνες των ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων PCR (Εικ. 14), και στον Πίνακα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα της PCR σε σύγκριση με εκείνα της ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου, για καθένα από τα δείγματα.

Εικόνα 14: Ηλεκτροφορήσεις προϊόντων PCR.



14. B



14. Γ



Πίνακας 8: Συγκριτικά αποτελέσματα αντισωμάτων και PCR.

A/A	ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	PCR	A/A	ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	PCR
1	Αρνητικό	-	42	Θετικό	-
2	Θετικό	-	43	Αρνητικό	-
3	Θετικό	+	44	Αρνητικό	-
4	Θετικό	+	45	Θετικό	-
5	Αρνητικό	-	46	Αρνητικό	-
6	Θετικό	+	47	Θετικό	-
7	Θετικό	-	48	Θετικό	-
8	Θετικό	-	49	Θετικό	+
9	Θετικό	-	50	Θετικό	+
10	Θετικό	-	51	Θετικό	-
11	Θετικό	+	52	Αρνητικό	-
12	Αρνητικό	-	53	Αρνητικό	-
13	Θετικό	-	54	Θετικό	+
14	Θετικό	-	55	Αρνητικό	-
15	Αρνητικό	-	56	Αρνητικό	-
16	Αρνητικό	-	57	Αρνητικό	-
17	Αρνητικό	-	58	Αρνητικό	-
18	Θετικό	+	59	Αρνητικό	-
19	Θετικό	+	60	Αρνητικό	-
20	Αρνητικό	-	61	Αρνητικό	-
21	Θετικό	-	62	Αρνητικό	-
22	Θετικό	+	63	Αρνητικό	-
23	Αρνητικό	-	64	Αρνητικό	-
24	Αρνητικό	-	65	Αρνητικό	-
25	Θετικό	-	66	Αρνητικό	-
26	Θετικό	+	67	Αρνητικό	-
27	Θετικό	-	68	Αρνητικό	-
28	Θετικό	+	69	Αρνητικό	-
29	Θετικό	-	70	Αρνητικό	-
30	Θετικό	+	71	Αρνητικό	-
31	Θετικό	-	72	Αρνητικό	-
32	Θετικό	+	73	Αρνητικό	-
33	Αρνητικό	-	74	Θετικό	+
34	Αρνητικό	-	75	Αρνητικό	-
35	Θετικό	-	76	Αρνητικό	-
36	Θετικό	-	77	Αρνητικό	-
37	Αρνητικό	-	78	Θετικό	+
38	Θετικό	-	79	Αρνητικό	-
39	Θετικό	-	80	Αρνητικό	-
40	Αρνητικό	-	81	Αρνητικό	-
41	Αρνητικό	-			

Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης για τα δείγματα, τα οποία ήταν θετικά στην αντίδραση, προκειμένου να ακολουθήσει κλωνοποίηση της αλληλουχίας που ενισχύθηκε. Η διαδικασία της κλωνοποίησης ξεκίνησε με την ένθεση των PCR προϊόντων στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(+). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E. coli*) με τον ανασυνδυασμένο φορέα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων και επιλογή των αποικιών που προήλθαν από κύτταρα μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένους φορείς (λευκές αποικίες), προκειμένου να μεταφερθούν σε υγρές καλλιέργειες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις καλλιέργειες αυτές, έτσι ώστε να ακολουθήσει η πέψη του με *PvuII*.

Πέψη πλασμιδιακού DNA:

Η πέψη του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση *PvuII* έγινε προκειμένου να επιβεβαιώσουμε για ποια από τα δείγματά μας πραγματοποιήθηκε η ένθεση του DNA στον φορέα pBluescript II.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης οδήγησε στη δημιουργία δύο προτύπων ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα ήταν:

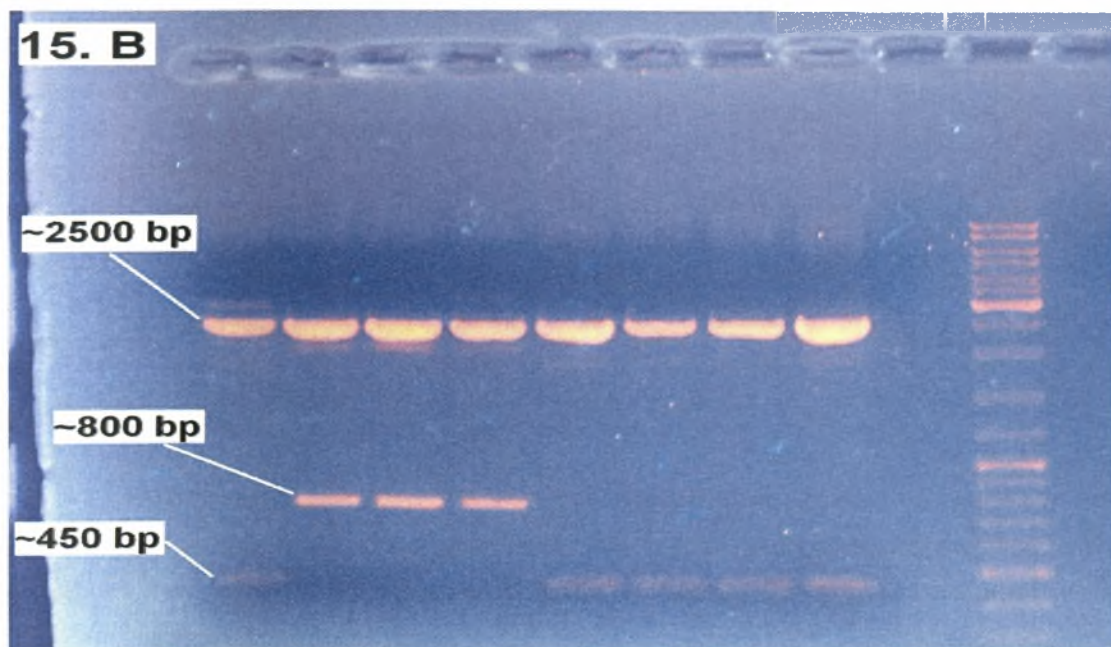
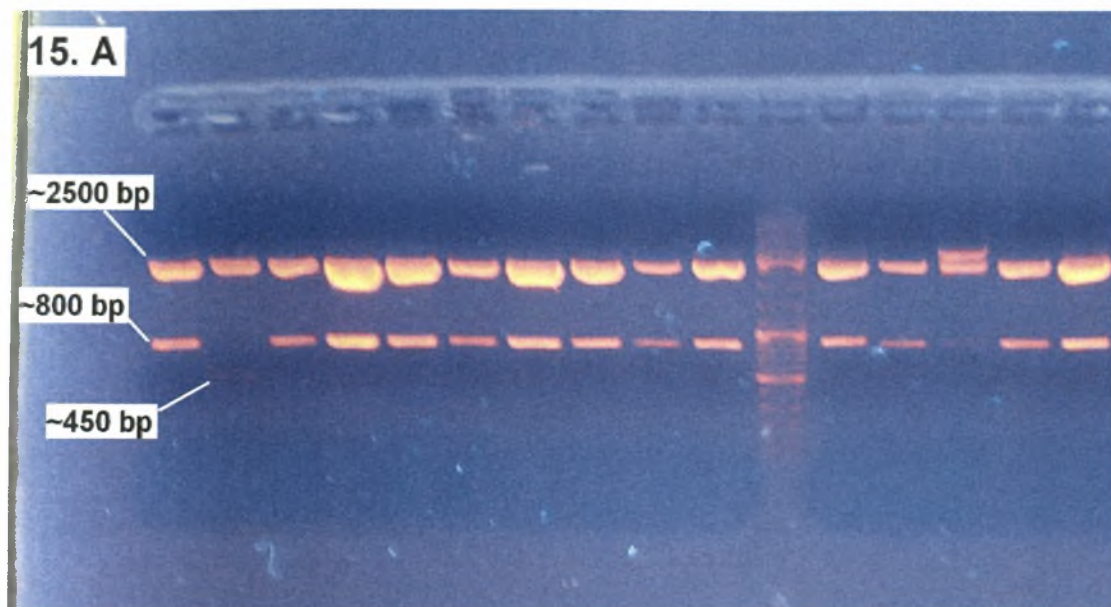
- Μία ζώνη μεγέθους περίπου 800bp, που αντιστοιχεί στο ένθεμα και τις αλληλουχίες του φορέα εκατέρωθεν του ενθέματος και μεταξύ των θέσεων περιορισμού του *PvuII*
- Μία ζώνη μεγέθους 2500bp, που αντιστοιχεί στον υπόλοιπο φορέα (π.χ. 1^η, 3^η, 4^η, κ.α. θέσεις του πηκτώματος στην *εικ. 15.A*)

Αντίθετα, το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης ενός μη ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα ήταν:

- Μία ζώνη μεγέθους περίπου 450bp, που αντιστοιχεί στην περιοχή μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης του ενζύμου
- Μία ζώνη μεγέθους περίπου 2500bp, που αντιστοιχεί στον υπόλοιπο φορέα (π.χ. 2^η θέση του πηκτώματος στην *εικ. 15.A* ή 1^η, 5^η, 6^η, κ.α. θέσεις στην *εικ. 15.B*)

Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων αυτών (*Εικ. 15*).

Εικόνα 15: Ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων πέψης του πλασμιδιακού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση *PvuII*.



Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός, μέσω εκχύλισης με φαινόλη/χλωροφόρμιο, του πλασμιδιακού DNA των δειγμάτων, στα οποία επιβεβαιώθηκε η κλωνοποίηση, και τα δείγματα αυτά στάλθηκαν προς αλληλούχιση.

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Η εφαρμογή της μεθόδου *Sanger* οδήγησε στην εύρεση μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων με μέγεθος περίπου 347bp, για όλα τα δείγματα, που ήταν θετικά στο παράσιτο. Με τη χρήση του NCBI Blast βρέθηκε ότι οι αλληλουχίες αυτές είχαν 100% ομολογία με το RNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας του παρασίτου. Ωστόσο, η ομολογία αυτή αφορούσε περισσότερα από ένα είδη παρασίτων. Συγκεκριμένα, τα τμήματα DNA, που ενισχύθηκαν και έπειτα κλωνοποιήθηκαν, παρουσίαζαν 100% ομολογία με το rDNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος των ειδών *L. infantum*, *L. donovani* και *L. chagasi*. Επομένως, δεν ήταν δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός του είδους της *Leishmania* από την οποία είχε προσβληθεί ο κάθε σκύλος.

Παρακάτω, παρουσιάζεται ενδεικτικά μια εικόνα του NCBI Blast για την αλληλουχία που ενισχύθηκε (Εικ. 16).

Εικόνα 16: NCBI Blast

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Leishmania infantum small subunit ribosomal RNA	640	640	99%	2e-180	100%
Leishmania donovani small subunit ribosomal RNA	640	640	99%	2e-180	100%
Leishmania chagasi small subunit ribosomal RNA	640	640	99%	2e-180	100%
Leishmania donovani gene for ribosomal RNA small subunit	634	634	99%	9e-179	99%
Leishmania infantum strain K1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	632	632	99%	3e-178	99%
Leishmania infantum chromosome 27	632	632	99%	3e-178	99%
Leishmania tropica small subunit ribosomal RNA	628	628	99%	4e-177	99%
Leishmania major small subunit ribosomal RNA	628	628	99%	4e-177	99%

>gb|M81429.1|LEIRRSSIN Leishmania infantum small subunit ribosomal RNA
Length=882

Score = 640 bits (346), Expect = 2e-180
Identities = 346/346 (100%), Gaps = 0/346 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	TCGCAACCTCGGTTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGAGGGGTTT	60
Sbjct	380	TCGCAACCTCGGTTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGAGGGGTTT	439
Query	61	CGGTTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGT	120
Sbjct	440	CGGTTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGT	499
Query	121	TCGGGGGAGAAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACT	180
Sbjct	500	TCGGGGGAGAAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACT	559
Query	181	ACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGTGTGGAGATCGA	240
Sbjct	560	ACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAGTGTGGAGATCGA	619
Query	241	AGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATC	300
Sbjct	620	AGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATC	679
Query	301	TTATGGGCCGGCCTGCGGCAGGGTTTACCCTGTGTCCAGCACCGCG	346
Sbjct	680	TTATGGGCCGGCCTGCGGCAGGGTTTACCCTGTGTCCAGCACCGCG	725

Ο συσχετισμός, που απεικονίζεται στην *Εικόνα 16*, βρέθηκε μεταξύ μιας από τις αλληλουχίες, που ενισχύθηκαν και του τμήματος του rDNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας της *L. infantum*. Το αποτέλεσμα ήταν ακριβώς το ίδιο και για τα στελέχη *L. donovani* και *L. chagasi*.

Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή, έγινε μια προσπάθεια να ταυτοποιηθούν τα είδη της *Leishmania* που προκαλούν λείσμανίαση στους σκύλους της Θεσσαλίας, καθώς οι μέχρι τώρα μελέτες αφορούσαν άλλες περιοχές της Ελλάδας, όπως την Κρήτη, την ευρύτερη περιοχή των Αθηνών, τα Ιόνια νησιά και τη Βορειοδυτική Ελλάδα.

Το αρχικό στάδιο της μελέτης ήταν η ανίχνευση αντισωμάτων κατά της *Leishmania* με τη χρήση μιας ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής έδειξαν ότι ένα ποσοστό περίπου 46% των σκύλων (οι 37 από τους 81), που εξετάστηκαν, είχε προσβληθεί από τη νόσο της λείσμανιάσης.

Στο επόμενο στάδιο, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), προκειμένου να ενισχυθεί ένα τμήμα του rDNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος της *Leishmania* με μέγεθος περίπου 345 bp. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR έδειξαν ότι μόνο το 20% των σκύλων (οι 16 από τους 81), που συμμετείχαν στη μελέτη, ήταν προσβεβλημένοι από κάποιο στέλεχος της *Leishmania*.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να παρατηρηθεί, ότι προέκυψε μια αρκετά μεγάλη διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό των θετικών αποτελεσμάτων της ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου (46%) και σε εκείνο των θετικών αποτελεσμάτων της PCR (20%). Η ανακολουθία αυτή φαίνεται πως οφείλεται στο γεγονός ότι κάποιοι από τους σκύλους είχαν ήδη λάβει κάποια θεραπεία έναντι του παρασίτου. Συγκεκριμένα, οι σκύλοι, που είχαν λάβει κάποιο φάρμακο κατά της λείσμανιάσης, βρέθηκαν αρνητικοί στην αντίδραση PCR. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη δράση του φαρμάκου, το οποίο είχε ήδη σκοτώσει τα παράσιτα, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει DNA της *Leishmania* στο δείγμα του μυελού των οστών αυτών των θεραπευμένων σκύλων. Επομένως, ήταν αδύνατη η ενίσχυση του rDNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας του παρασίτου. Ωστόσο, σε κάποιους από αυτούς τους σκύλους υπήρχαν ακόμη τα αντισώματα που είχε αναπτύξει το ανοσοποιητικό τους σύστημα, μετά την είσοδο του παρασίτου στον οργανισμό. Έτσι, παρά την εξόντωση του παρασίτου, τα αντισώματα δεν είχαν ακόμη καταστραφεί. Συνεπώς, η εφαρμογή της ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου στα δείγματα αυτών των σκύλων έδωσε θετικό αποτέλεσμα, ερχόμενη σε αντίθεση με το αρνητικό αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR.

Το τελικό στάδιο της μελέτης ήταν η κλωνοποίηση του τμήματος DNA που ενισχύθηκε με την PCR. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ενίσχυση του τμήματος αυτού προκειμένου να σταλεί για αλληλούχιση. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας έγινε με τη μέθοδο *Sanger* και οδήγησε στην εύρεση μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων μεγέθους ~347bp, για όλα τα δείγματα, που ήταν θετικά στην PCR. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα του NCBI Blast, προκειμένου να

βρεθεί ακριβώς σε ποιο τμήμα του DNA της *Leishmania* αντιστοιχούσε η αλληλουχία που προσδιορίστηκε για κάθε δείγμα. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι οι αλληλουχίες που προέκυψαν από όλα τα δείγματα μυελού είχαν 100% ομολογία με ένα τμήμα του rDNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας του παρασίτου. Ωστόσο, η ομολογία αυτή αφορούσε περισσότερα από ένα είδη παρασίτων και συγκεκριμένα, τα είδη *L. infantum*, *L. donovani* και *L. chagasi*. Επομένως, δεν ήταν δυνατό να επιτευχθεί ο ακριβής προσδιορισμός του είδους της *Leishmania* από την οποία είχε προσβληθεί ο κάθε σκύλος.

Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ενισχυμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντιστοιχεί στο γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί το rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, είναι μια υψηλά συντηρημένη περιοχή στα είδη αυτά του παρασίτου. Επομένως, οι εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, μπορούν μόνο να ανιχνεύσουν την παρουσία των παρασίτων αυτών στο μυελό των οστών των σκύλων και δεν είναι ικανοί να δώσουν επιπλέον αποτελέσματα για τον ακριβή προσδιορισμό του είδους του παρασίτου.

Συνεπώς, ο ακριβής προσδιορισμός του είδους του παρασίτου, από το οποίο έχει προσβληθεί ένας σκύλος, απαιτεί τη χρήση διαφορετικού ζεύγους εκκινητών. Τα εκκινητικά αυτά μόρια θα πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν μια περιοχή του DNA, που θα παρουσιάζει μικρότερη ομολογία μεταξύ των διαφορετικών ειδών της *Leishmania*, θα είναι, δηλαδή, λιγότερο συντηρημένη. Μια τέτοια περιοχή πιθανόν να είναι το DNA του κινητοπλάστη (kDNA-μιτοχονδριακό DNA) της *Leishmania*, το οποίο μπορεί να ενισχυθεί επιλεκτικά από τους ιστούς του ήπατος, του σπλήνα, του δέρματος, των λεμφαδένων και του μυελού των οστών του σκύλου. Η χρήση εκκινητών που ενισχύουν κάποιο τμήμα του kDNA ίσως να είναι καταλληλότερη για την ταυτοποίηση του είδους του παρασίτου από το οποίο έχει προκληθεί η λεισμανίαση σε έναν σκύλο.

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές μου, κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, κα. Πετεινάκη Ευθυμία και κ. Μπιλλίνη Χαράλαμπο, οι οποίοι συνέβαλαν στην εκπόνηση της μελέτης αυτής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Κωνσταντίνα Τσουμάνη για την βοήθεια που προσέφερε προκειμένου να διεξαχθεί το πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης μελέτης, όπως επίσης, και τη συμφοιτήτριά μου Αγγελική Κυριάζου για τη βοήθεια και κυρίως τη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Βιβλιογραφία:

1. LEISHMANIA, World Class Parasites Volume 4, Jay P. Farrell, Series Editors: Samuel J. Black and J. Richard Seed, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS
2. Cunningham, DD (1885). *On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil*. Scientific memoirs officers Medical Sanitary Departments Government India. Calcutta: Printed by the superintendent of government printing, India. pp. 21–31. OCLC 11826455.
3. Cox FE (2002). "History of human parasitology". *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (4): 595–612. doi:10.1128/CMR.15.4.595-612.2002. PMID 12364371.
4. Hoare C.A. (1938). "Early discoveries regarding the parasite of oriental sore". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **32** (1): 67–92. doi:10.1016/S0035-9203(38)90097-5.
5. a b "WHO: Leishmaniasis: background information". <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Retrieved on 2007-07-04.
6. "Leonard Goodwin - Telegraph". The Daily Telegraph. 14 January 2009. <http://www.telegraph.co.uk/news/obituaries/4241645/Leonard-Goodwin.html>. Retrieved on 2009-01-18.
7. Sergent, Edm, et al. *Revue historique du problème de la transmission des leishmanioses*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 26 :224-248, 1934
8. Napier L. E., et al. *The transmission of kala azar to hamsters by the bite of the sandfly, Phlebotomus argentipes*. *Ind. JI. Med. Res.*, 21: 299-304, 1933
9. Smith, R. O. A., Halder, K. C. and Ahmed J. *Further investigations on the transmission of kala azar. I-IV, VI*. *Ibid.*, 28:575-579, 581-584, 585-591, 1940; 29: 783-787, 799-802, 1941.
10. Swanimath, C.S., Shortt, H.E., and Anderson, L.A.P. *Transmission of Indian kala-azar to man by the bites of Phlebotomus argentipes*. *Ind. JI. Med. Res.*, 30:473-477, 1942. (First successful transmission from man to man)
11. Walters LL. 1993. *Leishmania differentiation in natural and unnatural sandfly hosts*. *J. Euk Microbiol* 40:196-206.

12. Lainson R. and Shaw JJ. 1979. *The role of animals in epidemiology of South American leishmaniasis*. In.: Lumsden WHR, Evans DA, eds *Biology of the Kinetoplastida*, London: Academic Press 2:1-116
13. <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/b/mel14198.png.php>
14. www.vet.uga.edu/.../leishmania/images/F12373.jpg
15. Lumsden, WHR 1974. *Biochemical taxonomy of Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68:74-75
16. Rioux JA, Lannote G., Serres E., et al. 1990 *Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification*. *Ann Parasitol. hum. comp.* 65:111-125
17. Rioux JA and Lannote G., 1993. *Apport de la cladistique a l'analyse du genre Leishmania*. Ross, 1903 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Corollaires épidémiologique. Biosystema*. 8: 79-90
18. Gossage SM., Rogers ME., Bates PA. *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. *Int. J Parasitol* 2003 33:1027-34
19. Ross R. *Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan*. *Brit Med J* 1903; 2:1261-1262.
20. Lainson R, Shaw JJ. *Evolution, classification and geographical distribution*. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987; 1:1-120.
21. Singh S. *New developments in diagnosis of leishmaniasis*. *Indian J Med Res* 2006; 123: 311–30.
22. Slappendel R. J., Ferrer L. *Leishmaniasis*. In: Green, C. E. (ed). *Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2nd edn*. Philadelphia: Saunders, 1998:450-458
23. Kontos V. J., Koutinas, A. F. *Old World Canine Leishmaniasis*. *Compendium* 1993; 7: 949-959
24. Bravo, L., Frank, L. A., Breneman, K. A. *Canine leishmaniasis in the United States*. *The Compendium on Continuing Education* 1993; 15:699-705
25. Gabriel Grimaldi, Jr., John R. David and Diane McMahon-Pratt. *Identification and Distribution of New World Leishmania Species Characterized by Serodeme Analysis Using Monoclonal Antibodies*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36(2), 1987, pp. 270-287
26. Stinson S, Sombre JR, Blum J. *Morphology of L. braziliensis changes*. *J Parasitol* 1989; 75: 431-40
27. Umakant Sharma & Sarman Singh. *Review Article: Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control*. *J Vector Borne Dis* 45, December 2008, pp. 255–272.
28. Kontos 1986, από WHO 1993

29. Garifallou A, Schnur LF, Stratigos JD, Hadziandoniou M, Savigos M, Stavrianeas N, et al. *Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. Ann Trop Med Parasitol.* 1984;78:369–75.
30. Adler S., Theodor O., Witenberg G. 1938: *Investigations on Mediterranean Kala Azar XI. A study of leishmaniasis in Canea (Crete). Proc. R. Soc. Lond., Ser. B.,* 125: 491–516.
31. Tselentis, Y., A. Gikas, and B. Chaniotis. 1994. *Kala-azar in Athens basin. Lancet* 343:1635
32. Ward RD. 1985. *Vector biology and control. In.: Chag KP, Bray RS eds. Leishmaniasis. Amsterdam: Elsevier* 199-212
33. Rondani C 1840. *Sopra una Specie di Insetto Dittero, Memoria prima per servire alla ditterologia italianan°1, Donati, Parma, 16 pp.*
34. Theodor O 1948. *Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Bull Ent Res* 39: 85-115.
35. Nitzulescu V 1931. *Essai de classification des Phlébotomes. Annals Parasit Hum Comp* 9: 271-275.
36. Lewis D. J. *Phlebotomid sandflies. Bull World Health Organ.* 1971; 44(4): 535–551
37. Rioux, J.A., E. Guilvard, J. Dereure, G. Lanotte, M. Denial, F. Pratlong, E. Serres and A. Belmonte: *Infestation naturelle de Phlebotomus papatasi (Scopoli, 1786) par Leishmania major MON-25. A propos de 28 souches isolées dans un foye du Sud marocain. In Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Application Eco épidémiologiques, Int. Coll. CNRS/INSERM/OMS, Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques, Montpellier, France, 1984, pp 471-480, 1986a*
38. Guilvard, E., J.A. Rioux, M. Gallego, F. Pratlong, J. Mahjour, E. Martinez-Ortega, J. Dereure, A. Saddiki and A. Martin: *Leishmania tropica au Maroc. III –Rôle vecteur de Phlebotomus sergenti. a propos de 89 isolats. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 66, 96-99, 1991*
39. Rioux, J.A., D.M. Jarry, G. Lanotte, R. Maazoun and R. Killick-Kendrick: *Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 18. Identification enzymatique de Leishmania infantum Nicolle, 1908, isolé de Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 spontanément infesté en Cévennes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 331-333, 1984*
40. Killick-Kendrick, R.: *The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin. Dermatol.* 17, 279-289, 1999
41. Killick-Kendrick, R.: *Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med. Vet. Entomol.* 4, 1-24, 1990a
42. Lewis, D.J.: *A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera, Psychodidae). Bull. Br. Mus. Nat. His.* 45, 121-209, 1982
43. Titus, R. G., and J. M. C. Ribeiro. 1988. *Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. Science* 239:1306-1308.
44. Artemiev MM, Neronov VM 1984. *Distribution and Ecology of Sandflies of the Old World (genus Phlebotomus), (USRR Com UNESCO Prog ManBiosph), Inst Evol Morphol Anim Ecol, USSR AcadSci, Moscow: 1-208. [in Russian]*

45. Léger, N., Depaquit, J., Ferte, H. et al. (2000) *Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the isle of Cyprus. II. Isolation and typing of Leishmania (Leishmania infantum Nicolle, 1908 (zymodeme MON1) from Phlebotomus (Larroussius) tobbi Adler and Theodor, 1930. Parasite, 7: 143-146*
46. Depaquit J, Ferte H, Leger N, Lefranc F, Alves Pires C, Hanafi H, Maroli M, Morillas-Marquez F, Rioux JA, Svobodova M, Volf P. (2002) *ITS 2 sequences heterogeneity in Phlebotomus sergenti and Phlebotomus simi/is (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit Leishmania tropica. Int J Parasitol 32:1123-1131*
47. Gemetchu T, Laskay T, Frommel D. *Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) of Ochollo, southwestern Ethiopia: species composition and natural infection of Phlebotomus pedifer with Leishmania aethiopica. 1990; Ethiop J Sci 13:43-50*
48. Umakant Sharma & Sarman Singh. *Review Article: Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis 45, December 2008, pp. 255–272*
49. Ivovic V., Patakakis M., Tselentis Y., Chaniotis B. (2007) *Faunistic study of sandflies in Greece. Med. and Vet. Entomol. 21:121-124*
50. Titus, R. G., and J. M. C. Ribeiro. 1990. *The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. Parasitol. Today 6:157-160.*
51. Ashford, RW. 1996. *Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin. Dermatol. 14:1-24*
52. Slappendel, R.J., and E. Teske in: Killick-Kendrick, R. (ed.): *Canine leishmaniasis: an update. Proc. Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, 1999, Intervet Int., Boxmeer, The Netherlands, 1999, 54-59*
53. Herrer A., Christensen HA. *Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. Ann. J. Trop. Med. Hyg. 1976. 25:59-63.*
54. Ciaramella P, Oliva G, De Luna R, et al: *A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. Vet Rec 141:539–543, 1997.*
55. McConnell EE, Chaffee EF, Cashell IG, Garner FM: *Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. JAVMA 156:197–201, 1970*
56. Ciaramella P, Papparella S, Oliva G: *Panofthalmitis granulomatosa bilaterale in corso di leishmaniosi del cane. Acta Medica Veterinaria (Napoli) 40:313–320, 1994.*
57. Cucinotta G, Ianelli N, Musicò M, et al: *La malattia articolare da Leishmania nel cane. ODV 11:73–76, 1995*
58. Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E: *Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with Leishmania donovani infection in a dog. J Small Anim Practice 39:29–31, 1997.*
59. Koutinas AF, Kontos V, Kaldrimidou H, et al: *Canine leishmaniasis associated nephropathy: A clinicopathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. Europ J Comp Anim Pract 5:31–38, 1995.*

60. Ferrer L, Juanola B, Ramos A, Ramis A: *Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs. Vet Pathol* 28:342–343, 1991
61. Ferrer L: Leishmaniasis, in Kirk RW, Bonagura JD (eds): *Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia, WB Saunders, 1992, p 266.*
62. Mónica López-Peña, Nuria Alemañ, Fernando Muñoz, Dolors Fondevila, María Luisa Suárez, Ana Goicoa and Jose María Nieto. *Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. Acta Veterinaria Scandinavica* 2009, 51:20
63. Saint-André Marchal, I., Marchal, T., Moore, P. F., Magnol, J. P., Bourdoiseau, G. *Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by Leishmania infantum in spontaneous canine leishmaniasis. Revue de Médecine Vétérinaire* 1997; 148:29-36
64. Fondevila, D., Vilafranca, M., Ferrer, L. *Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997; 56: 319–327.
65. Slappendel, R. J., Ferrer, L. *Leishmaniasis. In: Green, C. E. (ed). Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2nd edn. Philadelphia: Saunders, 1998: 450–458.*
66. Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J. et al. *Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum. Infection and Immunity* 1994; 62:229–235.
67. Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E. et al. *Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum-infected treated and untreated dogs. Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997; 59: 21–30.
68. Chiara Noli. *Canine leishmaniasis. Waltham Focus® Vol 9 NO 2. (1999)*
69. Denerolle, P. *Leishmaniose canine: difficulté du diagnostic et du traitement. Pratique Médicale et Chirurgienne des Animaux de Compagnie* 1996; 31: 137–145.
70. Ferrer, L. *Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. In: Proceedings of the Fourteenth Annual Congress of the European Society of Veterinary Dermatology, Pisa, 1997: 33–36.*
71. Ferrer, L., Rabanal, R., Domingo, M., Ramos, J., Fondevila, D. *Identification of L. donovani amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. Research in Veterinary Science* 1988; 44: 194–196.
72. Mancianti, F., Pedonese, F., Poli, A. *Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescent assay. Veterinary Parasitology* 1996; 65: 1–9.
73. Ferrer, L., Aisa, M. J., Roura, X., Portus, M. *Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Veterinary Record* 1995; 136: 514–516.
74. Harith, A. E., Slappendel, R. J., Reiter, I. et al. *Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-leishmania antibodies in the canine reservoir. Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 2252–2257.
75. Vercammen, F., De Deken, R. *Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis. The Veterinary Record* 1996; 139: 264.

76. Rodgers, M. R., Popper, S. J., Wirth, D. F. *Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Experimental Parasitology* 1990; 71: 267–275.
77. Berrahal, F., Mary, C., Roze, M. et al. *Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 1996; 55: 273–277.
78. <http://www.i-perros.com> και <http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/joiner/>
79. <http://www.flickr.com/photos/19187511@N00/page5>
80. Gramiccia M et al. *Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime®) of Leishmania infantum isolated from dogs after several courses of drug treatment. Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 1992; 86(6):613-620.
81. Shapiro TA, Were JBO, Danso K, et al: *Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside. Clin Pharmacol Ther* 49:506–514, 1991.
82. Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, et al: *A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. Vet Parasitol* 98:247–261, 2001.
83. Oliva G, Gradoni L, Cortese L, et al: *Comparative efficacy of meglumine antimonite and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol* 92:165–171, 1998.
84. Rhalem A, Sahibi H, Lasri S: *Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before and after drug treatment. Vet Immunol Immunopathol* 71:69–76, 1999.
85. Greene EC: *Antiprotozoal chemotherapy, in Green CE (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, WB Saunders, 1990, pp 758–762.*
86. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, et al: *Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. Antimicrob Agents Chemother* 34:183–188, 1990.
87. D'Ambrosio F, Gallo C, Agresti A: *The ketoconazole in the therapy of canine leishmaniasis. Proc Italian Soc Vet Sci* 40:492–496, 1986.
88. Pennisi MG, De Majo M, Masucci M, et al: *Efficacia della terapia combinata metronidazolo–spiramicina nel trattamento della leishmaniosi canina. Proc 2nd World Congr Leishmaniasis, 2001.*
89. Nicoletti P., Fruin J. *Treatment of canine cutaneous leishmaniasis. Trop. Anim. Hlth Prod.* (1974) 6:85-88.
90. Coutinho, M.T.Z. et al. (2005) *Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol.* 128, 149–155
91. Coutinho, M.T.Z. and Linardi, P.M. (2007) *Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? Vet. Parasitol.* 147, 320–325
92. Rosypal, A.C. et al. (2005). *Transplacental transmission of a North American isolate of Leishmania infantum in an experimentally infected beagle. J. Parasitol.* 91, 970–972
93. Andrade, H.M. et al. (2002) *Leishmania (Leishmania) chagasi is not vertically transmitted in dogs. Vet. Parasitol.* 103, 71–81

94. Diniz, S.A. et al. (2005) *Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of Leishmania sp. in the semen of naturally infected dogs*. *Vet. Pathol.* 42, 650–658
95. De Freitas, E. et al. (2006) *Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors*. *Vet. Parasitol.* 137, 159–167
96. Duprey, Z.H. et al. (2006) *Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003*. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 440–446.
97. <http://www.liv.uk/researchintelligense/issue18/shabbydog.html>
98. Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux C. et al. *Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology* 1997; 11: 105–111.
99. McMahon-Pratt D, Alexander J (October 2004). "Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease?". *Immunol. Rev.* 201: 206–24.
100. Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, et al. (September 2005). "Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of Leishmania parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs". *Vaccine* 23 (40): 4805–10..
101. Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LO, Palatnik-de-Sousa CB, Menz I (March 2007). "Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil". *Vaccine* 25 (12): 2180–6
102. Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H. 2006. *Drug resistance in leishmaniasis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:111-126.
103. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E (2003) *Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil* *Vet Parasitol* 111:161-173.
104. Desjeux, P. 1999. *Global control and Leishmania/HIV co-infection*. *Clin. Dermatol.* 17:317-325
105. Travi BL Cerro C, Cadena H, Montoya-Lerma, Adler GH. *Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sandflies from non-endemic areas*. *Res Vet Sci* 2002, 72:83-86
106. Lane RP. Sandflies (Phlebotominae) In: Lane RP, Crosskey RW editors. *Medical Insects and Arachnids*, 1st edition. London; New York: Chapman and Hall; 1993. p. 78-119.
107. Reithinger R, Davies CR: *Is the domestic dog (Canis familiaris) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence*. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61:530-541. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
108. Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ: *The first records of Leishmania (Leishmania) amazonensis in dogs*

(*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2007, 149:280-284.

109. Filipe Dantas-Torres. *Canine leishmaniosis in South America. Parasites & Vectors* 2009, 2(Suppl 1):S1. <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S1>

110. Chaniotis B., Gozalo-Garcia G., Tselentis Y. (1994). *Leishmaniasis in the large urban area of Athens, Greece. Entomological studies. Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88: 659-663.

111. Papadopoulos B. & Tselentis Y. (1994) *Sandflies in the greater area of Athens. Parasite*, 1: 131-140.

112. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". *J. Bacteriol* 174: 1550-1557. PMID 8432.

113. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH (1993). "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity". *PCR Methods Appl.* 2: 275-287. PMID 8324500.

114. *Protocol for PCR with Taq DNA Polymerase.*
<http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>

115. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M (2002). "Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach". *J. Clin. Lab. Anal.* 16 (1): 47-51. doi:10.1002/jcla.2058. PMID 11835531.

116. *Nucleic acid amplification protocols and guidelines.*
<http://www.promega.com/paguide/chap1.htm>.

117. *PCR Buffers and MgCl₂.* <http://www.studentsguide.in/animal-biotechnology/PCR-polymerase-chain-reaction/PCR-buffers-MGcl2.html>

118. Kunz BA, Kohalmi SE (1991). "Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels". *Annu. Rev. Genet.* 25: 339-59.

119. <http://www.obgynacademy.com/basicsciences/fetology/genetics/>

120. D.J. Sharkey, E.R. Scalice, K.G. Christy Jr., S.M. Atwood, and J.L. Daiss (1994). "Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction". *Bio/Technology* 12: 506-509.

121. *Polymerase chain reaction.*
http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

122. Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

123. *Agarose gel electrophoresis.*
http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose_gel_electrophoresis

124. Wizard® SV Gel and PCRClean-Up System.
<http://www.promega.com/TBS/TB308/tb308.pdf>

125. DNA cloning. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9A.htm>
126. B. R. Glick and J. J. Pasternak (2005). *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. ASM Press Washington, D. C.
127. Rossi, R., et al., *Functional characterization of the T4 DNA Ligase: a new insight into the mechanism of action*, *Nucleic Acids Res.*, 25, 2106-2113, 1997
128. Cherepanov, A.V., et al., *Binding of nucleotides by T4 DNA Ligase and T4 RNA Ligase: optical absorbance and fluorescence studies*, *Biophys. J.*, 81, 3545-3559, 2001.
129. Cleland, W.W., *Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups*, *Biochemistry*, 3, 480-2, 1964.
130. Tabor, Stanley. *DNA ligases*. Chapter in: *Current Protocols in Molecular Biology, Book 1*. 2001: Wiley Interscience.
131. <http://www.xenbase.org/other/static/methods/vector-files/pBSSKplus>
132. Altting-Mees, M.A. and Short, J.M., *pBluescript II: gene mapping vectors*, *Nucleic Acids Res.*, 17, 9494, 1989.
133. Altting-Mees, M.A., Sorge, J.A. and Short, J.M., *pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors*, *Meth. Enzymol.*, 216, 483-495, 1992.
134. Clark, J.M. (1988) *Novel non-templated nucleotide reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases*. *Nucleic Acids Rec.* 18:L 9677-9686
135. Holton, T.A. and Graham, M.W. (1991) *A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors*. *Nucleic Acids Res.* 19:1156
136. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields". *Embo J.* 1 (7): 841–5.
137. Purves WK. et. al. 2001. *Life: The Science of Biology*- 6th ed. Sinauer Associates, pp.316-317.
138. Weaver and Y. A. Chizmadzhev. "Theory of electroporation: A review " *Biochemistry and Bioenergetics*. 41. (1996) 135-160.
139. *Electroporation*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Electroporation>
140. Weaver JC. 1995. *Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms*. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 1-26.
141. Hanahan D, 1983. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*, *J Mol Biol* 166(4):557-80.
142. B. R. Glick and J. J. Pasternak (2005). *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. ASM Press Washington, D. C.
143. Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ (June 1998). "The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters. studied in Escherichia coli and Pseudomonas

fluorescens". *Curr. Microbiol.* **36** (6): 341–7. doi:10.1007/s002849900320. PMID 9608745. <http://link.springer-nv.com/link/service/journals/00284/bibs/36n6p341.html>

144. Birnboim HC, Doly J (November 1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513–23. PMID 388356. PMC 342324. <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=388356>

145. Roberts RJ (November 1976). "Restriction endonucleases". *CRC Crit. Rev. Biochem.* **4** (2): 123–64. doi:10.3109/10409237609105456. PMID 795607.

146. Gingeras T. R., Greenough L., Schildkraut I., Roberts R.J. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**:4525–4536.

147. Hengen, P. N., *Methods and reagents – Carriers for precipitating nucleic acids, TIBS.* **21**, 224–225, 1996.

148. Sanger F, Coulson AR (May 1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J. Mol. Biol.* **94** (3): 441–8. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2. PMID 1100841.

149. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (December 1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74** (12): 5463–7. doi:10.1073/pnas.74.12.5463. PMID 271968.

150. Leishmania Test. <http://www.fgmdiagnostics.it/Handlers/Pdf/ash?pdf=38>

151. GC series Magtraction ® -MagaZorb ® DNA Common Kit-200N. http://www.pssbio.com/products/DNA_Common_200N_101305.pdf

152. ROGERS K.A., TITUS R.G. 2003: *Immunomodulatory effects of Maxadilan and Phlebotomus papatasi sandfly salivary gland lysates on human primary in vitro immuneresponses.* *Parasite Immunol.* **25**: 127–134.

153. ROGERS K.A., DEKREY G.K., MBOW M.L., GILLESPIER.D., BRODSKYN C.I., TITUS R.G. 2002a: *Type 1 and type 2 responses to Leishmania major.* *FEMS Microbiol.Lett.* **209**: 1–7.

154. LEHN M., WEISER W.Y., ENGELHORN S., GILLIS S., REMOLD H.G. 1989: *IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-γ.* *J. Immunol.* **143**: 3020–3024

155. NORSWORTHY N.B., SUN J.R., ELNAIEM D., LANZAROG., SOONG L. 2004: *Sand fly saliva enhances Leishmania amazonensis infection by modulation interleukin-10 production.* *Infect. Immun.* **72**: 1240–1247.

156. HALL L.R., TITUS R.G. 1995: *Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production.* *J.Immunol.* **155**: 3501–3506.

157. MBOW M.L., BLEYENBERG J.A., HALL L.R., TITUS R.G.1998: *Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with Leishmania major.* *J. Immunol.* **161**:5571–5577.

158. KATZ O., WAITUMBI J.N., ZER R., WARBURG A. 2000: *Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 145–150.
159. S. Kamhawi, Y. Belkaid, G. Modi, E. Rowton, and D. Sacks, "Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies," *Science*, vol. 290, no. 5495, pp.1351–1354, 2000.
160. R. V. Morris, C. B. Shoemaker, J. R. David, G. C. Lanzaro, and R. G. Titus, "Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection," *The Journal of Immunology*, vol. 167, no. 9, pp. 5226–5230, 2001.
161. J. G. Valenzuela, Y. Belkaid, M. K. Garfield, et al., "Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 3, pp. 331–342, 2001.
162. J. M. Anderson, F. Oliveira, S. Kamhawi, et al., "Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis," *BMC Genomics*, vol. 7, p. 52, 2006.
163. J. G. Valenzuela, M. Garfield, E. D. Rowton, and V. M. Pham, "Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*," *The Journal of Experimental Biology*, vol. 207, no. 21, pp. 3717–3729, 2004.
164. D.-E. A. Elnaïem, C. Meneses, M. Slotman, and G. C. Lanzaro, "Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*," *Insect Molecular Biology*, vol. 14, no. 2, pp. 145–150, 2005.
165. R. S. Milleron, J.-P. Mutebi, S. Valle, et al., "Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 70, no. 3, pp. 286–293, 2004.

